



Fonctions biologiques d'EG-VEGF (Endocrine Gland-derived Vascular Endothelial Growth Factor) dans le développement placentaire

Pascale Hoffmann

► To cite this version:

Pascale Hoffmann. Fonctions biologiques d'EG-VEGF (Endocrine Gland-derived Vascular Endothelial Growth Factor) dans le développement placentaire. Gynécologie et obstétrique. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. <tel-00658354>

HAL Id: tel-00658354

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00658354>

Submitted on 10 Jan 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de science de l'université Joseph Fourier

**Fonctions biologiques d'EG-VEGF
(Endocrine Gland-derived
Vascular Endothelial Growth Factor)
dans le développement placentaire**

Soutenue publiquement le 15 Décembre 2006
Par Pascale HOFFMANN,
Née le 02 Mai 1967 à Ollioules (Var)

Devant le jury composé de :

- Pr Bernard SELE, président
- Dr Jean-Jacques FEIGE, directeur
- Pr Hervé DECHAUX, rapporteur
- Dr Jean PLOUET, rapporteur
- Dr Vincent SAPIN, examinateur
- Dr Nadia ALFAIDY, examinateur

A Eva, et à notre combat
A la mémoire de Françoise Vignon

A Monsieur le docteur Jean Plouet,
Qui malgré de très nombreuses obligations a accepté la lourde tâche d'être rapporteur de ce travail. Dans l'équipe tous s'accordent à dire que les perspectives de ma thèse seront enrichies par ses questions et commentaires,
Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude

A Monsieur le professeur Hervé Dechaud,
Il a d'abord été un exemple pour moi de conciliation de la clinique et de la réflexion. Par la pratique de notre spécialité, la gynécologie-obstétrique, je me sens proche de lui. Il était important pour moi qu'un gynécologue accoucheur accepte d'être rapporteur de ce travail,
C'est pourquoi je lui suis particulièrement reconnaissante d'avoir accepté. Hervé, un sincère merci.

A monsieur le doyen, le professeur Sèle,
Après m'avoir guidée vers la voie de la recherche, il me fait l'immense honneur de participer à ce jury de thèse. Qu'il puisse trouver en ce travail une petite compensation de l'investissement que la Faculté a fait en moi et soit assuré de ma grande reconnaissance.

A Monsieur le docteur Sapin,
Quelques mots échangés lors de journées de « placentistes », puis le parrainage INSERM de ma co-encadrante ont fait se croiser nos chemins. Son expertise du placenta murin me fait trembler. Il me fait la joie de bien vouloir participer à ce jury de thèse, qu'il lui en soit gré.

A Monsieur le docteur Feige,
Je me souviens des deux entretiens que tu m'as fait passer avant de m'accepter dans ton équipe, j'ai compris que l'EMI 105 c'était du très sérieux. Et j'ai été très heureuse d'être engagée dans ton équipe. Tu as été le premier à savoir traduire (j'espère que j'ai fait des progrès) mon langage approximatif, tu as toujours été là quand une question me bloquait pour avancer et je me suis sentie soutenue. Puisses-tu trouver en ce travail que j'ai essayé de faire le plus « scientifique » possible une expression de mon respect et de mon admiration. D'accord, une idée à la fois ! Merci Jean-Jacques, pour ces trois ans où tu m'as dirigée et pour les années à venir que j'espère fructueuses...

A Madame le docteur Alfaïdy-Benharouga,
Je pense que je t'ai un peu déconcerté au début, mais tu sais maintenant que tu peux me faire confiance. Tu as guidé tous mes pas dans le laboratoire, tu as su me permettre de continuer, même quand la fatigue des gardes me faisait voir tout en noir. Grâce à toi et à ton expertise, je ne verrais plus jamais un placenta comme avant...J'espère que tu pourras être fière du travail de ta doctorante. Et j'espère surtout que nous pourrions continuer à travailler ensemble sur les si nombreux projets qui naissent de nos discussions. Pour tous ces temps de partage qui m'ont tant appris et pour ta participation à mon jury, merci du fond du cœur Nadia.

A Michelle Kéramidas, sans elle combien de fois serais-je restée « plantée » ? Je ne mélangerai plus les cônes de 20 et 200µl, mais penserai à toi à chaque fois ...

A Laurent David, « SOS-où-est-le-bouton-marche-de-mon-ordinateur », « explicateur » précis devant qui je n'ai jamais eu honte de ne pas savoir (c'est quoi le cyber-green ?), pour son amitié et son irrespect...

A Christine et Sandrine, mes pauvres collègues de bureau (bonjour, je voudrais parler au Dr Hoffmann), qui m'ont même vu dormir...

A tous les membres de cette belle « équipe Feige », pour qui un « bonjour, ça va ? » est une vraie question...et qui savent toujours trouver une minute ou deux pour de la chaleur humaine. Nous sommes trop nombreux et je ne mettrais pas tous les prénoms, mais je vous remercie tous pour ces années, ces rencontres, ces aides et ces fous-rires.

A Ana, ma tête de mule,
A Kosta, mon si sensible,
A Slavko, mon grand imbécile,
A Baka, belle-mère si facile,
A mes parents,
Merci

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|-----------|
| Table des figures..... | 7 |
| Table des tableaux..... | 8 |
| ABREVIATIONS | 9 |
| PARTIE I :..... | 11 |
| LE PLACENTA..... | 14 |
| PLACENTA HUMAIN..... | 15 |
| Développement placentaire précoce physiologique..... | 16 |
| Développement placentaire ultérieur..... | 26 |
| Envahissement et remodelage des artères spiralées..... | 31 |
| PLACENTA MURIN..... | 35 |
| Le placenta murin à 9,5 jpc, début du labyrinthe..... | 37 |
| Le placenta murin mature, à 11,5 jpc | 37 |
| Le placenta murin de 13,5 jpc à terme..... | 38 |
| Fonctionnement endocrinien de l'unité materno-foeto-placentaire murine..... | 39 |
| Comparaison du placenta humain et murin | 39 |
| L'ANGIOGENESE PLACENTAIRE | 44 |
| Acteurs principaux de la morphogenèse vasculaire..... | 45 |
| La famille du VEGF et de ses récepteurs | 46 |
| Les angiopoïétines et leurs récepteurs | 49 |
| Le système Eph/Ephrines | 50 |
| Les molécules d'adhérence et la matrice extra-cellulaire | 51 |
| HIF-1 et la régulation des facteurs angiogènes par l'hypoxie | 52 |
| Mécanismes moléculaires régissant l'acquisition du caractère invasif des cytotrophoblastes..... | 55 |
| La pression partielle en oxygène | 56 |
| Les facteurs de croissance | 57 |
| Les facteurs angiogènes..... | 58 |
| Circulation foeto-maternelle | 64 |
| La structure placentaire humaine définitive..... | 67 |
| Quelques notions de rhéologie | 67 |
| Vasculogenèse placentaire..... | 69 |
| Facteurs angiogènes durant la vasculogenèse..... | 71 |
| Angiogenèse placentaire | 71 |
| Formation du réseau capillaire 32 jpc à 22 SA : angiogenèse avec branchement | 73 |
| Formation des vaisseaux souches de 15 SA à 32 SA..... | 74 |
| Régression du réseau capillaire périphérique de 15 à 32 SA..... | 75 |
| Prévalence de l'angiogenèse sans branchement de 25 SA à terme..... | 75 |
| Récapitulatif des étapes de l'angiogenèse physiologique..... | 76 |
| DEUX CONSEQUENCES D'UN DEVELOPPEMENT PLACENTAIRE HUMAIN | |
| PATHOLOGIQUE : LE RETARD DE CROISSANCE INTRA-UTERIN ET LA TOXEMIE | |
| GRAVIDIQUE..... | 77 |
| Le retard de croissance intra-utérin (RCIU)..... | 78 |
| La toxémie gravidique | 79 |
| Le rôle de l'ischémie placentaire dans l'établissement de la toxémie gravidique | 80 |
| Argumentaire en faveur de la responsabilité de l'hypoxie | 80 |
| Mécanisme principal conduisant à l'hypoxie | 81 |
| La théorie immuno-vasculaire ou « La grossesse, état inflammatoire » | 84 |

| | |
|---|-------------------|
| Marqueurs de toxémie gravidique..... | 86 |
| Facteurs de risque..... | 86 |
| Le récepteur soluble au VEGF, sFlt-1, marqueur de toxémie..... | 87 |
| Autre marqueur de dysfonction endothéliale : l'endogline..... | 89 |
| Récapitulatif | 89 |
| <i>LE EG-VEGF ET SES RECEPTEURS.....</i> | <i>91</i> |
| Découverte d'un nouveau facteur angiogène spécifique des cellules endothéliales des glandes endocrines : le EG-VEGF | 92 |
| Protéines homo- et orthologues..... | 93 |
| Structure de EG-VEGF et des protéines apparentées | 95 |
| Récepteurs de EG-VEGF et de Bv8..... | 97 |
| Les voies de signalisation des récepteurs PKR-1 et PKR-2 | 99 |
| EG-VEGF et Bv8 : différence humain/souris | 100 |
| EG-VEGF en gynécologie..... | 101 |
| <i>PARTIE II : RESULTATS.....</i> | <i>107</i> |
| Objectifs du travail | 109 |
| Article 1..... | 112 |
| Discussion | 142 |
| Article 2..... | 145 |
| Discussion | 172 |
| Article 3, en cours d'élaboration | 174 |
| Rôle mitogène de EG-VEGF sur les cytotrophoblastes villositaires..... | 175 |
| Rôle de EG-VEGF sur les cytotrophoblastes extravillous..... | 176 |
| Conclusion | 178 |
| <i>PARTIE III : PERSPECTIVES.....</i> | <i>180</i> |
| Perspectives fondamentales..... | 181 |
| Perspectives cliniques..... | 181 |

Table des figures

| | |
|--|-----|
| FIGURE 1 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA MULTIPLICATION DES CELLULES EMBRYONNAIRES DURANT LEUR TRAJET DE L'AMPOULE TUBAIRE VERS L'ENDOMETRE. | 18 |
| FIGURE 2 : ACTEURS DU DIALOGUE ENDOMETRE/EMBRYON PENDANT LA PHASE D'APPOSITION. | 18 |
| FIGURE 3 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES TROIS DESTINS POSSIBLES POUR UN TROPHOBLASTE. | 19 |
| FIGURE 4 : REPRESENTATION DE L'INVASION EMBRYONNAIRE AUTOUR DU 12^{EME} JOUR POST-FECONDATION. | 21 |
| FIGURE 5 : REPRESENTATION DE LA PROLIFERATION ET DE L'INVASION SYNCYTIOTROPHOBLASTIQUE. | 22 |
| FIGURE 6 : REPRESENTATION DE L'ETABLISSEMENT DE LA COQUE TROPHOBLASTIQUE. | 23 |
| FIGURE 7 : ECHOGRAPHIE PRECOCE (6SA) DANS UN PLAN TANGENTIEL A L'INSERTION OVULAIRE, MONTRANT UN RICHE RESEAU VASCULAIRE ENDOMETRIAL AUTOUR DE LA ZONE D'IMPLANTATION. | 24 |
| FIGURE 8 : SCHEMA REPRESENTANT LE ROLE DE L'OXYGENE (POINTS BLEUS) DANS LE DEVELOPPEMENT DU DISQUE PLACENTAIRE. | 26 |
| FIGURE 9 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU DEVELOPPEMENT DE L'ARBRE VILLOSITAIRE. | 27 |
| FIGURE 10 : IMAGE A FORT GROSSISSEMENT D'UN GROUPEMENT DE KYSTES TROPHOBLASTIQUES CARACTERISTIQUES D'UNE MOLE HYDATIFORME. | 30 |
| FIGURE 11 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA CIRCULATION ARTERIELLE MATERNELLE DANS LE MYOMETRE ET L'ENDOMETRE SUS-JACENT. | 32 |
| FIGURE 12 : INVASION TROPHOBLASTIQUE ET MODIFICATION DES INTEGRINES EXPRIMEES PAR LES DIFFERENTS SOUS-TYPES DE TROPHOBLASTES. | 34 |
| FIGURE 13 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU DEVELOPPEMENT DU LABYRINTHE MURIN A 9,5 JPC. | 37 |
| FIGURE 14 : STRUCTURE SCHEMATISEE DU PLACENTA MURIN A TERME. | 38 |
| FIGURE 15 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE COMPARATIVE DES PLACENTAS HUMAIN ET MURIN. | 41 |
| FIGURE 16 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UNE COUPE DE PLACENTA HUMAIN A TERME. | 42 |
| FIGURE 17 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UNE COUPE DE PLACENTA MURIN, PASSANT PAR LE LABYRINTHE. | 43 |
| FIGURE 18 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES LIAISONS DES MEMBRES DE LA FAMILLE DU VEGF A LEURS DIFFERENTS RECEPTEURS. | 49 |
| FIGURE 19 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ACTION DU FACTEUR HIF1-A SUR LA TRANSCRIPTION DE GENES EN REPONSE A L'HYPOXIE. | 54 |
| FIGURE 20 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES LOCALISATIONS DE ANG-2 ET TIE-2 A L'INTERFACE FOETO-MATERNELLE. | 61 |
| FIGURE 21 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES LOCALISATIONS DE EPHB4, EPHRINE1 ET EPHRINE2 A L'INTERFACE FOETO-MATERNELLE AU PREMIER TRIMESTRE. | 63 |
| FIGURE 22 : SCHEMA DE LA CIRCULATION FETALE DANS CHAQUE TRONC VILLOSITAIRE. | 65 |
| FIGURE 23 : MEMBRANE VASCULO-SYNCYTIALE. | 66 |
| FIGURE 24 : MISE EN PLACE DU SYSTEME VASCULAIRE FOETAL DANS LA VILLOSITE. | 70 |
| FIGURE 25 : SCHEMA DE LA CIRCULATION DE TYPE ADULTE. | 73 |
| FIGURE 26 : COMPARAISON DE MOULAGES DE LA VASCULARISATION INTRA-VILLOSITAIRE A DIFFERENTS AGES GESTATIONNELS. | 76 |
| FIGURE 27 : LES ROLES DES PRINCIPAUX SYSTEMES REGULATEURS DES CELLULES ENDOTHELIALES. | 76 |
| FIGURE 28 : SCHEMA REPRESENTANT L'IRRIGATION DE LA CHAMBRE INTERVILLEUSE AVANT LA DISPARITION DES BOUCHONS TROPHOBLASTIQUES (8 SA) ET APRES LEUR DISPARITION, APRES 12 SA. | 81 |
| FIGURE 29 : SCHEMA RECAPITULATIF DE LA TOXEMIE GRAVIDIQUE. | 90 |
| FIGURE 30 : STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DE MIT-1 ET DE LA COLIPASE. | 96 |
| FIGURE 31 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA STEROÏDOGENESE OVARIENNE AU SEIN DES DEUX COMPARTIMENTS FOLLICULAIRES. | 102 |
| FIGURE 32 : SCHEMA RECAPITULATIF DU CYCLE MENSTRUEL ENDOMETRIAL, MONTRANT LA TRANSFORMATION FINALE DES ARTERES SPIRALEES. | 102 |

| | |
|---|-----|
| FIGURE 33 : SCHEMA DES DEUX PHASES DE RECRUTEMENT AMENANT CHEZ L'HUMAIN A LA MATURATION ET A L'OVULATION D'UN FOLLICULE DOMINANT | 105 |
| FIGURE 34 : IMMUNOHISTOCHEMIE DE PKR-1 (A) ET PKR-2 (B) DANS DES VILLOSITES PLACENTAIRES A 11 SA. | 143 |
| FIGURE 35 : EXPRESSION PROTEIQUE DE PKR-1 ET PKR-2..... | 174 |
| FIGURE 36 : EFFET DU EG-VEGF SUR LA PROLIFERATION DES CYTOTROPHOBLASTES..... | 175 |
| FIGURE 37 : EFFET DE EG-VEGF SUR L'INVASION DES TROPHOBLASTES EXTRAVILLEUX. | 177 |
| FIGURE 38 : EFFET DE EG-VEGF SUR LA MIGRATION DES TROPHOBLASTES EXTRAVILLEUX HTR-SVNEO A 24 HEURES | 149 |
| FIGURE 39 : EFFET DE EG-VEGF SUR L'INVASION DES TROPHOBLASTES EXTRAVILLEUX. | 149 |
| FIGURE 40 : DOPPLER DES ARTERES UTERINES..... | 182 |
| FIGURE 41 : EXPRESSION DU EG-VEGF EN FONCTION DU STATUT DOPPLER DES ARTERES UTERINES, DANS DES PLACENTAS TOTAUX ISSUS D'IVG ENTRE 12 ET 14 SA..... | 183 |

Table des tableaux

| | |
|---|----|
| TABLEAU 1 : FACTEURS REGULES, SOUPÇONNES DE L'ETRE OU PROBABLEMENT REGULES PAR HIF-1. | 56 |
| TABLEAU 2 : PRINCIPAUX FACTEURS DE RISQUE PRE-CONCEPTIONNELS DE TOXEMIE GRAVIDIQUE, GROUPES SELON LEUR TYPE..... | 87 |
| TABLEAU 3 : PRINCIPALES APPELATIONS DES PROTEINES APPARENTÉES A EG-VEGF ET BV8 FIN 2003. | 94 |
| TABLEAU 4 : SEQUENCE DES ACIDES AMINES DES PROTEINES AVIT MATURES DANS DIFFÉRENTES ESPECES. | 95 |

ABREVIATIONS

AA : acides aminés

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ALK-1 : Activin receptor-Like Kinase 1

Ang-1 à 4 : angiopoïétine 1 à 4

Bv8 : Bombina variegata 8 (peptide de 8 kDa issu des sécrétions cutanées de la grenouille Bv)

ACE : Adrenal Cortex-derived Endothelial Cells , cellules endothéliales dérivées de capillaires de cortex surrénalien

bFGF : basic Fibroblast Growth Factor, facteur basique de croissance des fibroblastes aussi appelé FGF-2

CT : cytotrophoblaste

EG-VEGF : Endocrine Gland-derived Vascular Endothelial Growth Factor , facteur de croissance vasculaire de l'endothélium dérivé des glandes endocrines

Eph : Erythropoïetin-Producing human Hepatocellular carcinoma cell line, récepteurs des éphrines

FGF : Fibroblast Growth Factor, facteur de croissance des fibroblastes

FIV : fécondation in vitro

Flk-1 : Fetal Liver Kinase-1, récepteur de type 2 du VEGF

Flt-1 : Fms-like tyrosine kinase-1, récepteur de type 1 du VEGF

FSH : Follicle Stimulating Hormone, hormone folliculo-stimulante

Gi : protéine G inhibitrice

GPI : Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol

HCG : Human Chorionic Gonadotropin hormone, hormone chorionique gonadotrophique

HCS : Human Chorionic Somatomammotropin hormone, hormone somatomammotrophique

HELLP syndrome : Hemolysis high Enzymes Level Low Platelets syndrome, syndrome de la grossesse associant une hémolyse, des enzymes hépatiques élevées et des plaquettes basses.

HIF-1 : hypoxia inducible factor-1, facteur inductible par l'hypoxie-1

HLA-G : Human Leucocyte Antigen-G, antigène humain leucocytaire de type G

hPL : Human Placental Lactogen hormone, hormone placentaire lactogène humaine

HRE : Hypoxia responsive element, élément de réponse à l'hypoxie

HTA : hypertension artérielle

jpc : jour post-coïtum

LH : Luteinizing Hormone , hormone lutéinisante
 LIF : leukemia inhibiting factor
 MEC : matrice extra-cellulaire
 MAP p42 : Mitogen-Activated Protein-p42 , aussi appelée ERK2
 MAP p44 : Mitogen-Activated Protein-p44 , aussi appelée ERK1
 M-CSF : macrophage-colony stimulating factor
 MMP-2 et 9 : Matrix MetalloProtease-2 et -9 , métallo-protéinase de la matrice
 NCAM : «Neuronal Cell Adhesion Molecule , molécule d'adhésion cellulaire neuronale
 NRP-1 et -2 : neuropiline-1 et -2, récepteurs du VEGF
 NOS : Nitric Oxyde Synthase , synthétase de NO
 PKC : Protéine Kinase C
 PKR-1 et -2 : «prokineticin receptor-1 or -2 , récepteurs des prokinétines
 PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor-1, inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1
 PDGF : Platelet-Derived Growth Factor, facteur de croissance dérivé des plaquettes
 PECAM-1 : Platelet and Endothelial Cell Adhesion Molecule-1, molécule d'adhésion cellulaire des plaquettes et de l'endothélium
 PlGF : placental growth factor, facteur de croissance placentaire
 pO₂ : pression en oxygène
 pVHL : protéine (facteur) Von Hippel Lindau.
 RCPG : Récepteurs Couplés à des Protéines G
 RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
 RCIU : retard de croissance intra-utérin
 SA : semaines d'aménorrhée
 s-endogline : endogline soluble
 ST : syncytiotrophoblaste
 TEV : trophoblastes extravilleux
 TFPI : tissue inhibitor pathway inhibiteur
 TGF- β : transforming Growth Factor- β
 TIMPs : Tissue Inhibitor of MetalloPeptidase, inhibiteur tissulaire de métalloprotéase
 VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor, facteur de croissance vasculaire endothélial
 VE-cadherin : Vascular Endothelial-cadherin , cadhérine de l'endothélium vasculaire

PARTIE I : INTRODUCTION

La compréhension des mécanismes régissant la formation de nouveaux vaisseaux est un élément crucial pour appréhender les événements conduisant à l'établissement de la circulation foeto-placentaire au travers du placenta.

Les différentes étapes du développement placentaire, de l'invasion endométriale par le blastocyste au placenta définitif, partagent de façon étonnante de nombreux points communs avec l'invasion et la vascularisation tumorale. En effet, les deux phénomènes nécessitent :

- la prolifération, la migration et l'invasion à travers une matrice extra-cellulaire,
- la capacité à avoir accès à la vascularisation de l'hôte, et à recruter un flux sanguin.

En dépit de ces similitudes, il existe deux différences majeures entre les deux :

- pendant la grossesse normale, l'invasion et la formation de nouveaux vaisseaux sont limitées, au contraire de ce qui se passe pendant la progression tumorale
- l'embryon au cours de son développement, non seulement utilise la vascularisation maternelle, mais développe également une vascularisation propre, à l'inverse d'une tumeur qui ne peut que détourner à son profit une vascularisation déjà existante.

Il existe cependant, au cours des grossesses, diverses situations où la mise en place de la circulation foeto-maternelle n'est pas optimale. Une prolifération insuffisante serait responsable de certains avortements spontanés précoces, dans un contexte de stress oxydatif. Une invasion insuffisante serait responsable de la majorité des dysgravidies. Une invasion excessive serait incriminée dans les pathologies de l'adhérence placentaire telles que les *placentae accreta*, *percreta* et *increta*. Enfin, il existe des cas de véritables tumeurs placentaires, les choriocarcinomes.

Afin de bien comprendre les intrications existant entre le développement placentaire et le développement du nouveau réseau vasculaire fœtal, je définirai artificiellement dans un premier temps les différentes étapes de la placentation physiologique humaine et dans un deuxième temps, je ferai le point sur les connaissances actuelles de l'angiogenèse au cours des différentes étapes du

développement placentaire. En effet, ces deux phénomènes se développent en même temps, et une anomalie de l'une entraînera forcément une anomalie de l'autre. Nous présenterons aussi les événements participant à la transformation des artères spiralées utérines, parfois appelée pseudo vasculogenèse, et qui permettent la réalisation des échanges materno-fœtaux dans des conditions optimales. Ceci nous amènera à présenter dans une troisième partie deux pathologies de la placentation lors desquelles les échanges sont limités, le retard de croissance intra-utérin et la toxémie gravidique.

Comme nous le verrons dans ce travail, la mise en place du placenta nécessite une coordination finement orchestrée entre les cellules placentaires spécialisées que sont les différents types de trophoblastes et les vaisseaux fœtaux et maternels.

En 2001, un nouveau facteur angiogène, le EG-VEGF, a été décrit et son action a été montrée comme spécifique de l'endothélium des glandes endocrines. Il était exprimé de façon significative dans le placenta. La spécificité d'action de ce facteur ouvrait de grandes perspectives dans le domaine thérapeutique spécialement dans la lutte antitumorale.

Cette spécificité d'action sur l'endothélium des glandes endocrines nous laissait présager d'un effet particulièrement ciblé sur le développement placentaire. La physiopathologie de la toxémie gravidique - pathologie fréquente de la grossesse qui est responsable de près de la moitié de la grande prématurité - n'est que partiellement connue. L'angiogenèse placentaire et la pseudo-vasculogenèse modifiant les artères spiralées sont des clés de son établissement.

Je présente donc dans la dernière partie de cette thèse les travaux que nous avons entrepris pour comprendre l'implication d'EG-VEGF dans la placentation physiologique et sa possible participation à la toxémie gravidique.

LE PLACENTA

PLACENTA HUMAIN

Développement placentaire précoce physiologique

Cette partie présente les différentes étapes de la mise en place du placenta humain.

Phase pré-implantatoire

Le zygote humain, dès sa formation, commence des divisions qui l'amèneront au stade préimplantatoire. Dans le même temps, il effectue une migration qui l'amène de l'ampoule tubaire à la cavité utérine. Durant les premiers jours du développement, le zygote se divise à l'intérieur de la zone pellucide. Les cellules se multiplient sans augmentation de taille. Au 4^{ème} jour, il existe environ 16 cellules, on parle du stade de *morula*. Le phénomène de compaction entre en jeu, les cellules externes de cette « petite mûre » forment une paroi épithéliale compacte de trophoblastes. Au 5^{ème} jour a lieu l'éclosion (*hatching*) de l'embryon qui s'extrait de la zone pellucide. Au 6^{ème} jour, l'embryon composé d'environ 64 cellules forme le blastocyste et s'appose à la muqueuse utérine, préparant son invasion. A ce stade, le blastocyste est composé de la couche trophoblastique externe, d'un pôle cellulaire formant la « masse cellulaire interne » (*Inner Mass Cell*), et d'une cavité liquidienne, le blastocèle. L'invasion embryonnaire humaine est interstitielle, nécessitant une pénétration totale dans l'endomètre maternel décidualisé. Un schéma résume ces premières étapes figure 1.

De très nombreux facteurs de croissance sont impliqués dans ces premières étapes, et même le transport de l'embryon au travers de la trompe nécessite une synchronisation de nombreuses sécrétions.

Il est surprenant de noter que l'embryon peut s'implanter dans n'importe quel tissu de l'organisme maternel (grossesses ectopiques tubaires, ovariennes, intestinales...), mais pas dans l'endomètre maternel en dehors de la « fenêtre implantatoire ». Lors de cette fenêtre, des pinopodes sont formés à la surface des cellules épithéliales endométriales, favorisant « l'ancrage » de l'embryon. Cet état est régulé finement par des mécanismes complexes et orchestrés

(décidualisation induite par la progestérone en particulier, induction cytokinique par l'hormone Chorionique Gonadotrophique (HCG) produite par l'embryon dès avant son apposition, production de VEGF qui augmente la perméabilité vasculaire endométriale, immunomodulation par le TGF β). De très nombreux autres facteurs sont impliqués dans ce dialogue précoce endomètre/embryon. Les plus connus sont :

- le LIF (Leukemia Inhibiting Factor), sécrété par l'endomètre et dont les récepteurs se trouvent sur l'embryon. Le LIF stimule ainsi la production d'HCG par les trophoblastes.
- le M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor)
- Le EGF (Epidermal Growth Factor), agissant sur la réceptivité des cellules épithéliales endométriales.
- l'interleukine-1 (IL-1), dont la production par l'embryon est stimulée par divers facteurs produits par l'endomètre.

Au total, l'embryon au stade de blastocyste se retrouve au 6^{ème} jour apposé en face de l'endomètre maternel préparé, et commence les transformations nécessaires à l'invasion. La figure 2 représente cette étape d'apposition. Cette étape précède de très peu la phase d'adhérence. L'adhérence fait intervenir des glycoprotéines de surface et crée des complexes jonctionnels serrés entre trophoctoderme et endomètre. Il est maintenant bien démontré que ces phénomènes de « roulement/apposition/adhérence » de l'embryon au sein de l'endomètre sont très proches de ceux empruntés par les leucocytes lors des phénomènes de « roulement/ adhérence/extravasation » dans l'endothélium vasculaire lors des phénomènes inflammatoires (Dominguez, Yanez-Mo et al. 2005).

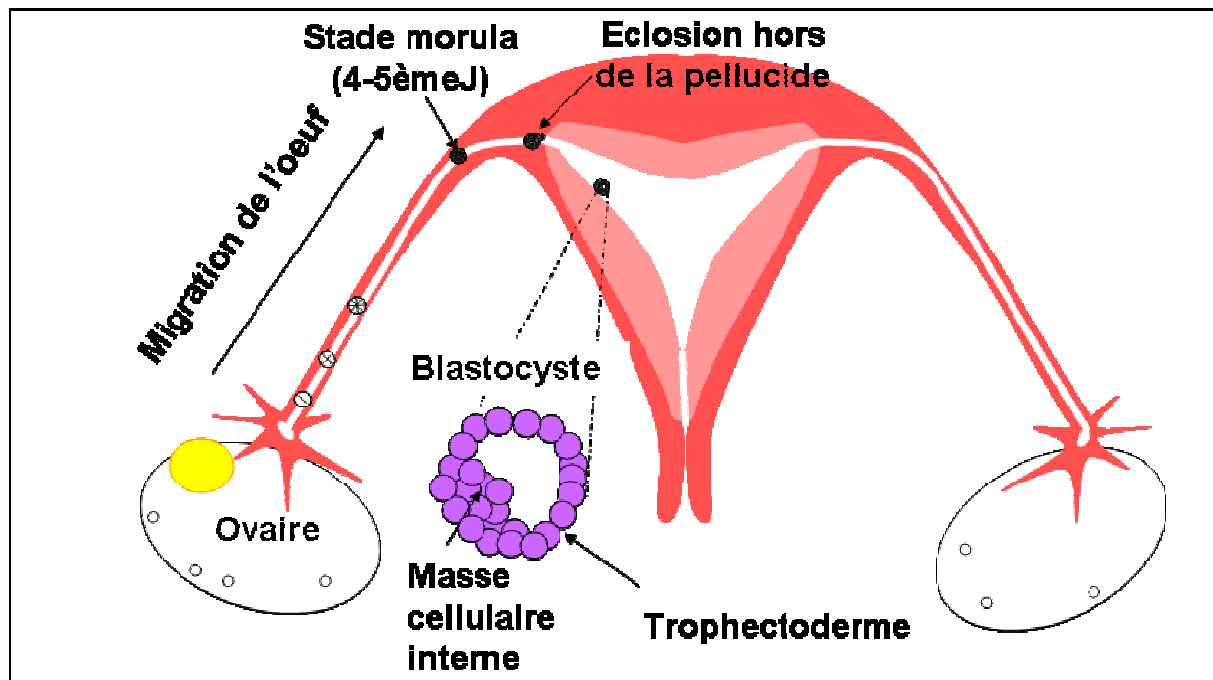


Figure 1 : représentation schématique de la multiplication des cellules embryonnaires durant leur trajet de l'ampoule tubaire vers l'endomètre.

Au 6^{ème} jour, le blastocyste va s'apposer à l'endomètre, et modifier les caractéristiques du trophectoderme en regard de la zone d'apposition.

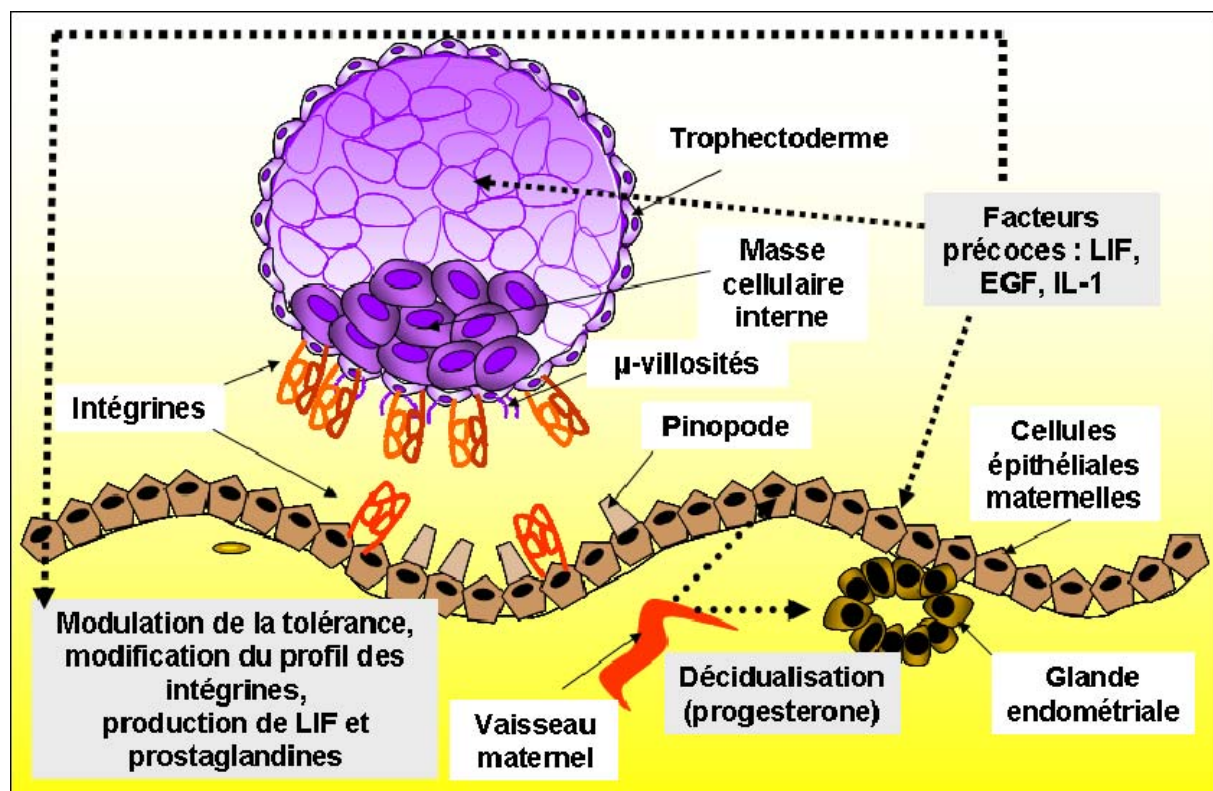


Figure 2 : acteurs du dialogue endomètre/embryon pendant la phase d'apposition

6^{ème} jour post fécondation. (Staun-Ram and Shalev 2005)

Phase implantatoire

C'est donc la couche trophoblastique externe (trophectoderme) qui va se trouver au contact de l'endomètre maternel. A ce stade, les trophoblastes vont avoir trois destins possibles, selon trois voies de différenciation. La figure 3 présente ces voies.

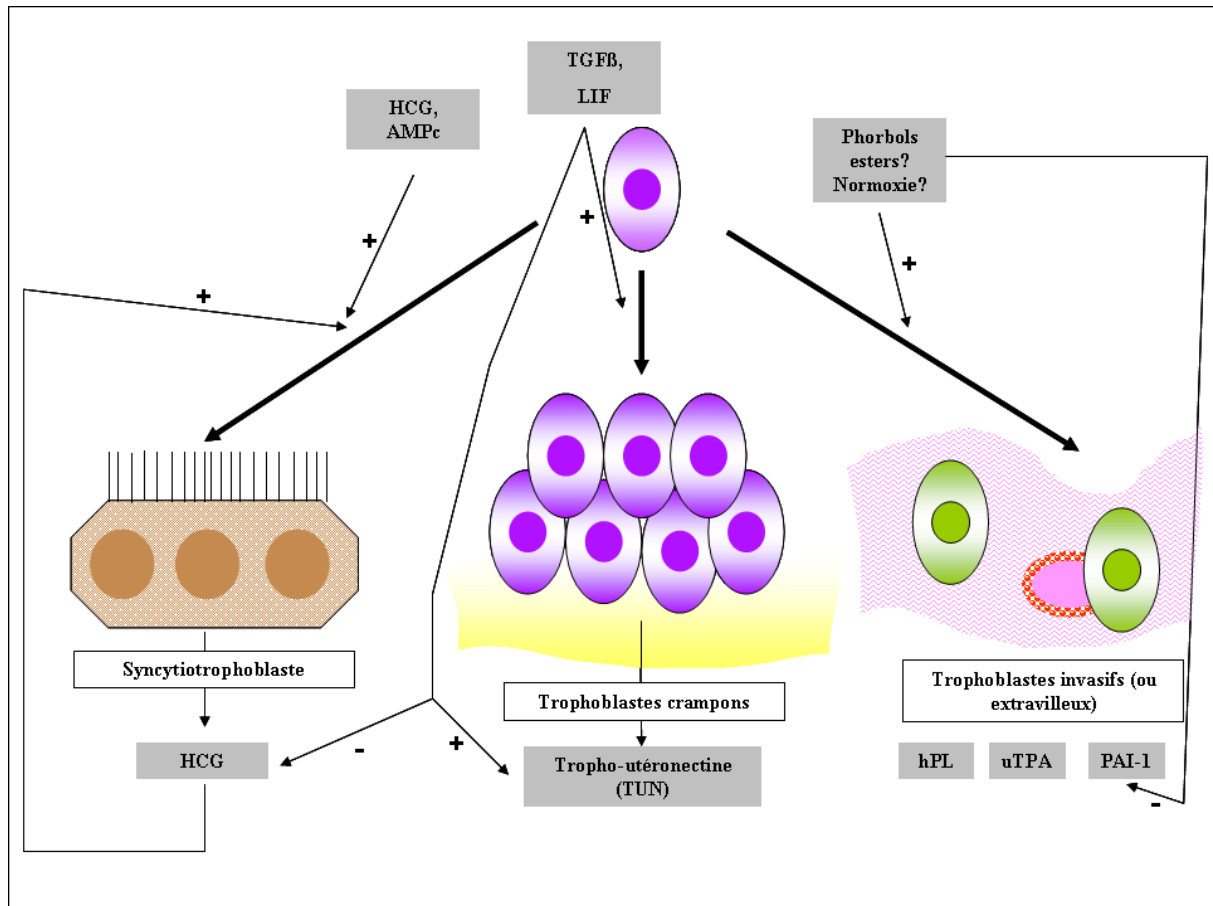


Figure 3: représentation schématique des trois destins possibles pour un trophoblaste.

Sous l'influence de la sécrétion d'HCG, il peut se différencier en syncytiotrophoblaste, le TGF-β et le LIF vont favoriser l'ancrage par la différenciation en villosités crampons, les facteurs concernant l'acquisition du phénotype extra-villeux invasif sont moins connus. adapté d'après (Kliman 2000).

Le trophoctoderme se différencie très rapidement à l'extérieur en une couche de syncytiotrophoblastes. Ces cellules ne se divisent pas, sont formées par la fusion de plusieurs trophoblastes et possèdent plusieurs noyaux. Les syncytiotrophoblastes vont avoir le rôle de l'unité endocrine placentaire, puisqu'ils vont sécréter les hormones de la grossesse, et particulièrement l'HCG. Cette hormone va compléter la réaction déciduale endométriale initiée

par la progestérone produite par le corps jaune, l'endomètre maternel devenant oedématié et plus réceptif à l'invasion ovulaire.

De plus, la laminine du tissu conjonctif maternel va être reconnue par les syncytiotrophoblastes via leurs intégrines, et ainsi déclencher la libération d'enzymes protéolytiques. Les trophoblastes se trouvent donc en contact avec la MEC maternelle et ses signaux.

Les syncytiotrophoblastes vont former des cordons proliférants circonférentiels, sous-tendus en leur centre par des cytotrophoblastes dont les mitoses accélérées alimentent le développement des cordons. Ces cordons envahissent de proche en proche l'endomètre maternel. Ils rencontrent chemin faisant les glandes endométriales, les artères et les veines spiralées, qui vont être localement détruites par les phénomènes de protéolyse. Les glandes endométriales participeraient à la fourniture énergétique du *conceptus*, mais également au dialogue cytokinique (Hempstock, Cindrova-Davies et al. 2004). La destruction des artères et des veines met en contact les cellules trophoblastiques avec les composants sanguins maternels dès cette deuxième semaine de développement. Nous verrons plus loin que ce contact va rapidement cesser grâce à l'établissement de la coque trophoblastique. Au 14^{ème} jour post-fécondation, l'œuf est entièrement enfoui dans l'endomètre qui le recouvre entièrement.

La représentation schématique de cette phase et les mécanismes moléculaires impliqués sont présentés figure 4.

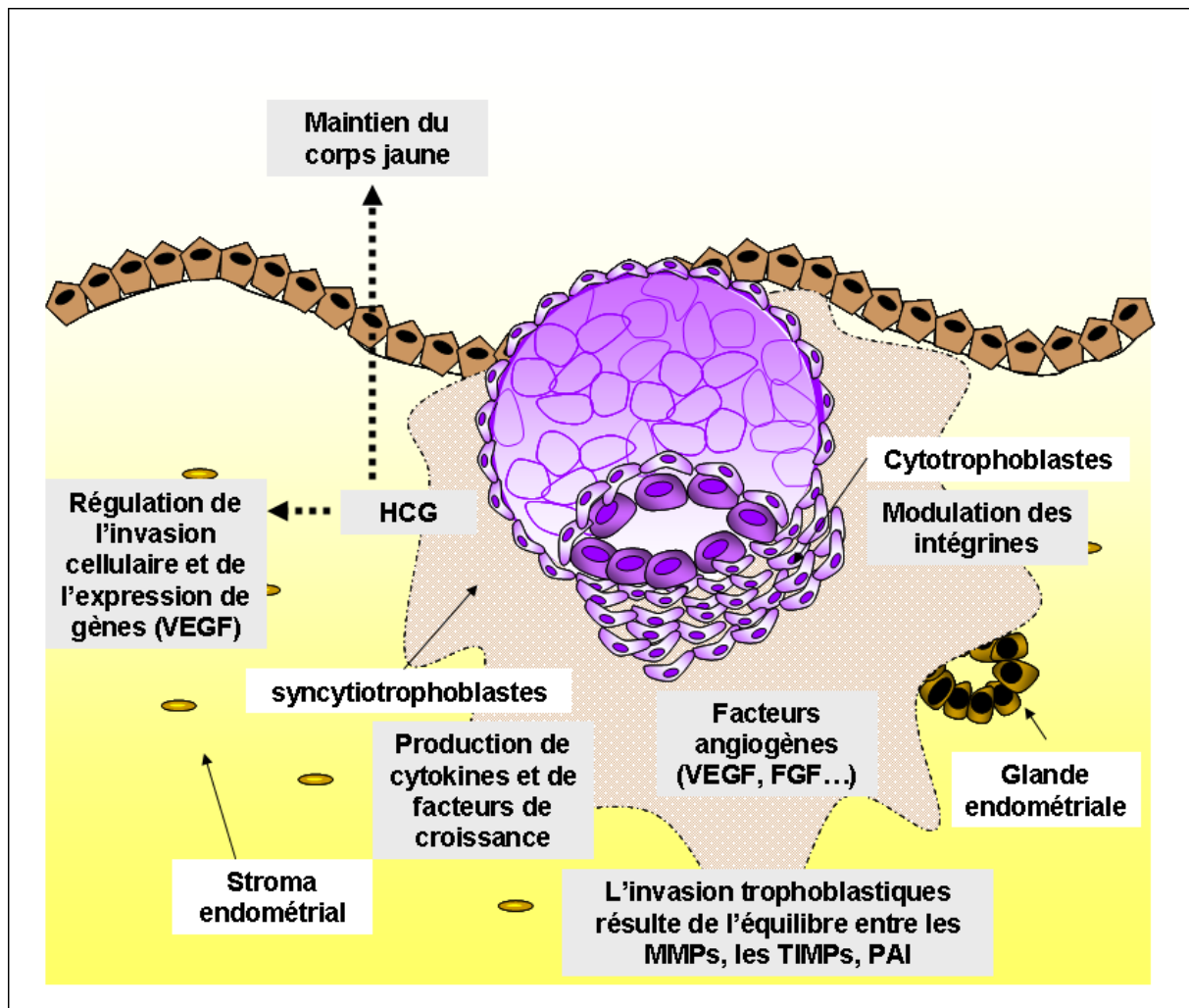


Figure 4 : représentation de l'invasion embryonnaire autour du 12^{ème} jour post-fécondation.
Le syncytiotrophoblaste joue un rôle prépondérant dans le contrôle de l'invasion, par la sécrétion de nombreux facteurs (cadres gris), d'après (Staun-Ram and Shalev 2005).

Phase de mise en place des structures villositaires

Villosités primaires

Entre le 11^{ème} et le 13^{ème} jour, les cordons syncytiotrophoblastiques « poussés » en leur centre par les cordons de cytotrophoblastes vont former une couronne périphérique. Ainsi se trouvent créés les villosités primaires (figure 5 A). Des lacunes se créent entre les cellules syncytiales, qui vont confluer ensuite pour donner les chambres intervillieuses, bordées par des syncytiotrophoblastes.

Villosités secondaires

L'invasion trophoblastique de la décidue maternelle se poursuit jusqu'à atteindre le tiers interne du myomètre. Vers le 16^{ème} jour post-fécondation, le mésoblaste extraembryonnaire (prolongement

de l'allantoïde), bordé de cytotrophoblastes, envahit l'axe des villosités primaires (figure 5 A), formant ainsi les villosités secondaires (figure 5 B).

Villosités tertiaires

Vers le 21^{ème} jour, le mésoblaste extra-embryonnaire se différencie en tissu conjonctif dans lequel va se mettre en place la vasculo- puis l'angiogenèse fœtale, à partir des précurseurs hémangioblastiques (voir chapitre angiogenèse, paragraphe angiogenèse placentaire). Le développement de cette circulation fœtale va intervenir sur le développement villositaire (figure 5 C)

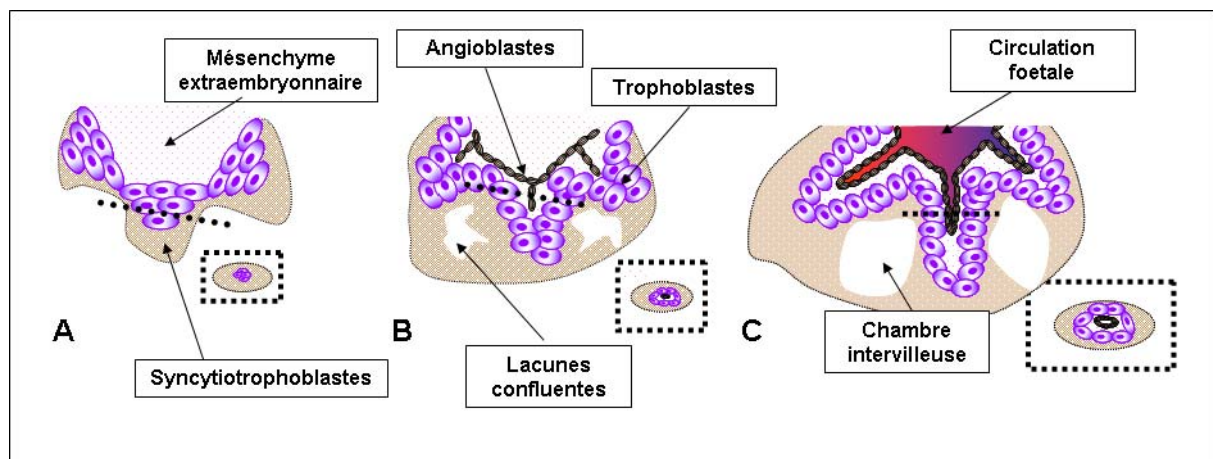


Figure 5 : représentation de la prolifération et de l'invasion syncytiotrophoblastique.

Sous-tendue par la prolifération cytotrophoblastique, formant les villosités primaires (A), secondaires (B) et tertiaires (C). Parallèlement les progéniteurs angioblastiques vont former les premiers tubules qui donneront progressivement la circulation fœtale intravillonnaire. En encadré, sous chaque type de villosité se trouve la coupe représentée par le trait hachuré.

Villosités crampons et coque trophoblastique :

Une partie des villosités tertiaires va s'ancrer plus profondément, constituant les villosités crampons. La limite chez l'humain est représentée par la couche compacte de la décidue. Ce sont les villosités crampons qui vont rapidement créer la coque trophoblastique, véritable barrière qui permet alors à l'embryon de bénéficier d'un environnement pauvre en oxygène pour poursuivre son développement.

Au contact de la couche compacte de l'endomètre, les cytotrophoblastes des villosités crampons, sous l'influence de facteurs locaux, continuent à proliférer, puis vont dépasser la couche de syncytiotrophoblastes au site d'ancrage. Ils deviennent ainsi des trophoblastes extravillositaires, qui vont s'étendre latéralement également, envahir les vaisseaux maternels – formant les « bouchons trophoblastiques » -, et entourant ainsi le *conceptus* d'une véritable « coque » de cytotrophoblastes (figure 6).

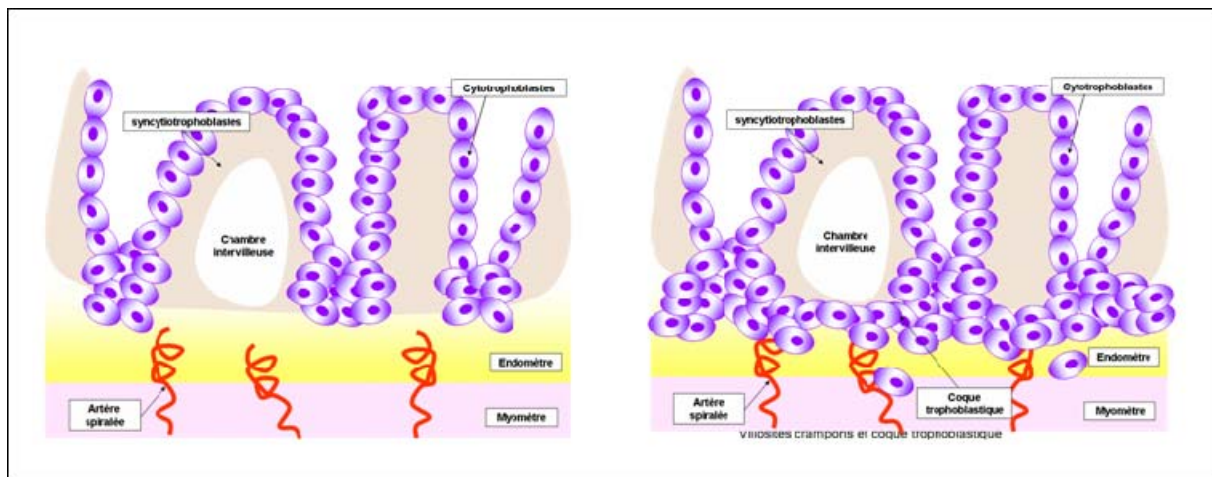


Figure 6 : Représentation de l'établissement de la coque trophoblastique.

Les cytotrophoblastes des villosités crampons débordent le syncytium et prolifèrent latéralement pour finir par former une zone continue. Ils vont former des bouchons dans les structures vasculaires qu'ils rencontrent (artères et veines spiralées).

Cette coque semble présente à partir de la 3^{ème} semaine de développement (5^{ème} semaine d'aménorrhée) et disparaît peu à peu à partir de la 10^{ème} semaine de développement. Ainsi, jusqu'à ce terme, la chambre intervillueuse se trouve baignée par un percolat maternel, dépourvu de globules rouges. Les villosités crampons vont également donner naissance aux colonnes de trophoblastes invasifs, trophoblastes extravilloux (TEV), qui perdent tout contact avec la villosité elle-même. Comme nous le présentons plus loin, les caractères invasifs des TEV interstitiels sont de plus en plus exprimés au fur et à mesure de leur éloignement du pied de la villosité.

Avant la 3^{ème} semaine de développement (5^{ème} SA), les syncytiotrophoblastes qui érodent la MEC et les extrémités des vaisseaux maternels vont être en contact direct avec le sang maternel. Cependant, par une régulation de facteurs pro- et anti-coagulants, dont certains activés par les

syncytiotrophoblastes eux-mêmes – comme le TFPI « tissu factor pathway inhibitor » - un développement optimal du lit placentaire dans une grande majorité de grossesses est obtenu.

Modifications vasculaires maternelles induites précocement par l'implantation

Dès le début de l'implantation on détecte par échographie doppler une modification de la vascularisation dans l'endomètre et le myomètre. Ceci est également visible au niveau des artères utérines qui restent dilatées au lieu de revenir à leur tonus habituel à la fin d'un cycle sans grossesse. Cette action manifestée localement et à distance du site d'implantation est vraisemblablement liée à la libération de facteurs vasodilatateurs et de facteurs angiogènes. En effet, un réseau vasculaire extrêmement dense se développe autour du site d'implantation et de la couronne trophoblastique qui est en train de se développer. On constate ainsi un accroissement du débit local et une intensification du réseau jusqu'au tiers moyen du myomètre. La figure 7 montre une échographie précoce avec un réseau vasculaire péri ovulaire développé.



Figure 7 : échographie précoce (6SA) dans un plan tangentiel à l'insertion ovulaire, montrant un riche réseau vasculaire endométrial autour de la zone d'implantation (cliché donné par E.Andrini, échographiste au CHU).

Formation des membranes : l'oxygène en question

Nous avons vu que les trophoblastes proliféraient à partir du trophoctoderme sur le pourtour du *conceptus*, créant au départ une « boule chevelue ». Cependant, les villosités régressent sur une grande partie de cette sphère, ne laissant plus que les membranes fœtales, formées de deux feuillets - l'amnion et le chorion -. Pendant longtemps, les phénomènes régissant une telle régression sont restés mystérieux. Depuis peu, l'équipe de Burton à Cambridge (Burton, Skepper et al. 2003; Jauniaux, Hempstock et al. 2003), propose une théorie où l'oxygène est le principal acteur. En effet, ils ont démontré le rôle toxique de l'oxygène sur le développement villositaire, son implication dans de nombreux arrêts précoces de grossesse (fausses-couches précoces) et proposent également un lien avec le développement placentaire insuffisant conduisant aux pathologies obstétricales que sont le retard de croissance intra utérin (RCIU) et la toxémie gravidique. Pour eux, c'est l'oxygène et ses dérivés actifs qui induisent une apoptose des trophoblastes, et provoquent une involution des villosités. Dans le développement placentaire optimal, des signaux de prolifération trophoblastique permettent aux villosités placentaires les plus proches de l'insertion du cordon ombilical de se développer et de se protéger de l'oxygène transporté par le sang maternel. Dans les pathologies obstétricales, leur théorie est qu'une prolifération trophoblastique insuffisante, et donc une coque trophoblastique inefficace, soumettrait les villosités placentaires en croissance à une concentration en oxygène trop importante dans la chambre intervillieuse, à un stade où elles ne possèdent pas encore d'enzymes anti-oxydantes, entraînant une dégénérescence inadéquate. Ceci est présenté schématiquement figure 8.

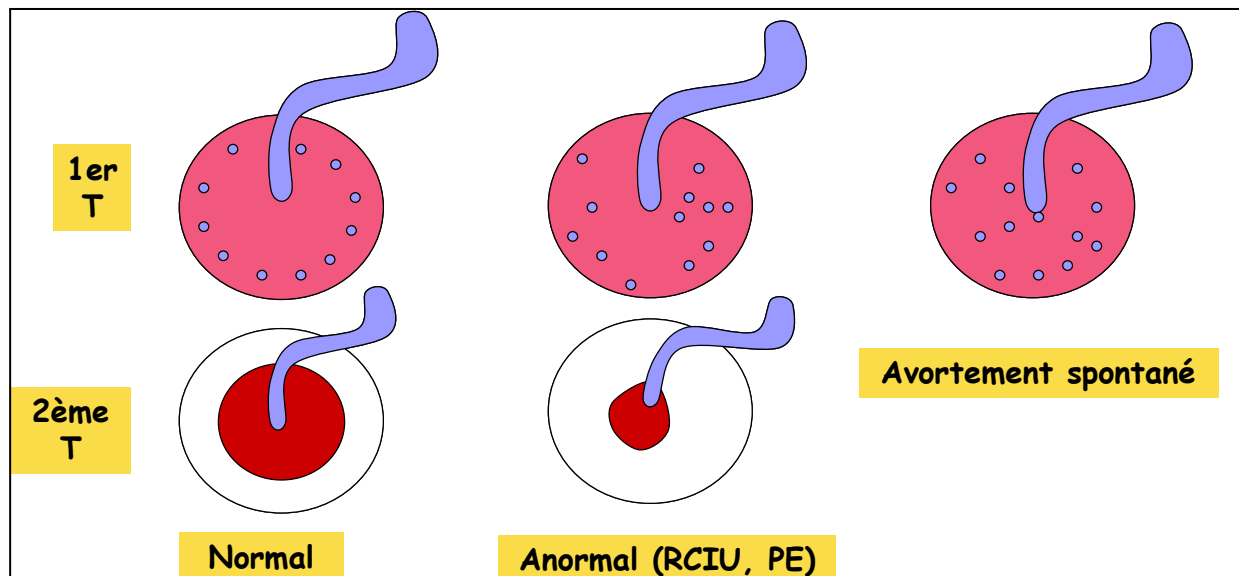


Figure 8: Schéma représentant le rôle de l'oxygène (points bleus) dans le développement du disque placentaire.

Une invasion trophoblastique insuffisante pourrait être cause de bouchons trophoblastiques insuffisants, conduisant à un début trop précoce de la circulation maternelle, induisant placenta « réduits » ou avortements spontanés, d'après (Burton and Jauniaux 2004)

Développement placentaire ultérieur

Croissance et multiplication de la surface d'échange : les villosités définitives

L'embryon humain établit rapidement sa circulation vers la mère au sein des villosités tertiaires, aussi appelées villosités mésenchymateuses (dès la fin de la troisième semaine de développement) tout en restant protégé des radicaux libres produits par la circulation maternelle grâce au rôle de filtre joué par la coque trophoblastique. Vers la 7^{ème} semaine d'aménorrhée, les villosités mésenchymateuses se transforment en villosités intermédiaires immatures, qui elles-mêmes vont donner les villosités souches. A la fin du deuxième trimestre il n'y a plus de formation de villosités mésenchymateuses, mais les villosités intermédiaires immatures continuent à donner naissance à des villosités souches. Les villosités souches peuvent encore donner naissance à des villosités intermédiaires immatures. A terme, seules quelques villosités intermédiaires immatures persistent au centre des lobules placentaires. Au début du troisième trimestre, les villosités mésenchymateuses ne se transforment plus qu'en villosités intermédiaires matures. Ce sont ces dernières qui donnent au final des villosités terminales, majoritairement retrouvées à terme.

Au cours du premier et deuxième trimestre de la grossesse, le phénomène majeur de développement est le bourgeonnement (ou *sprouting* des anglo-saxons). Comme dans les vaisseaux, la villosité va subir un bourgeonnement à partir de « zones chaudes » (« *hot spots* »). Au fur et à mesure du développement vasculaire fœtal dans la villosité, celle-ci va se trouver occupée par des structures différentes, acquérant un phénotype différent. La figure 9 schématise les différentes étapes des transformations villositaires jusqu'à la villosité terminale.

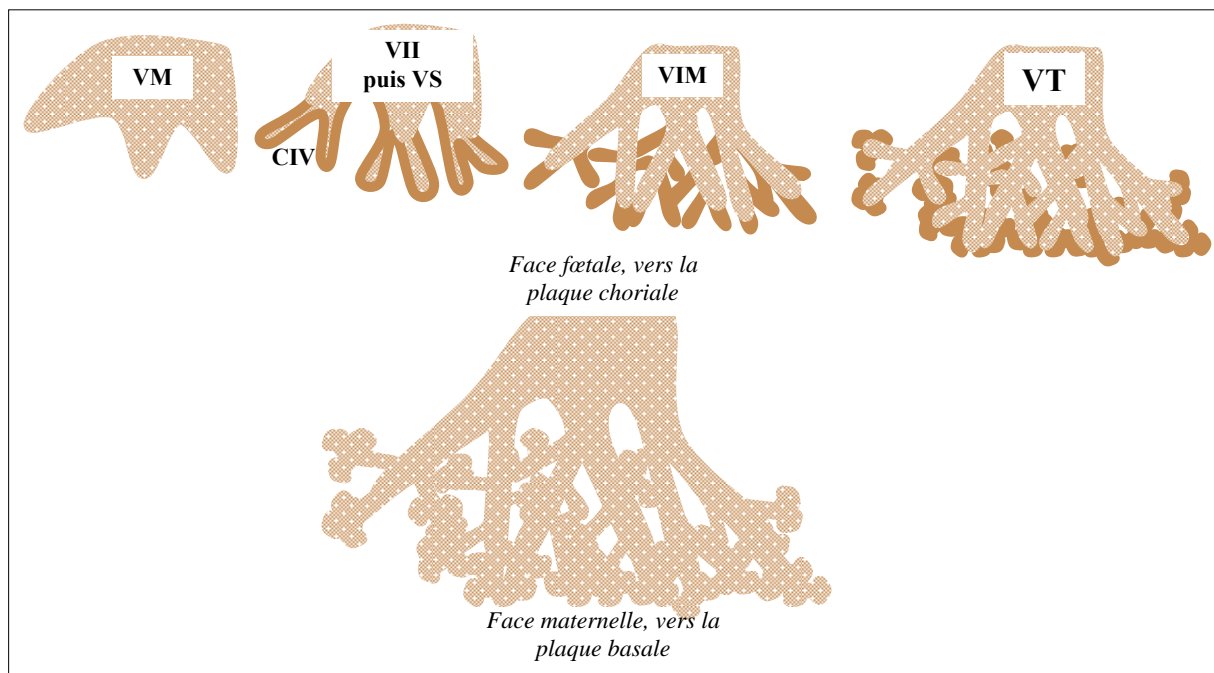


Figure 9 : représentation schématique du développement de l'arbre villositaire.

La villosité mésenchymateuse (VM) donne naissance à des villosités intermédiaires immatures (VII). Elles baignent dans la chambre intervillieuse (CIV). Les villosités intermédiaires immatures vont se transformer en villosités souches. Les villosités intermédiaires matures (VIM) apparaissent au début du troisième trimestre et finalement, par bourgeonnements terminaux, les VIM donnent les villosités terminales (VT). Noter l'aspect en grappe caractéristique des terminaisons villositaires du placenta mature (image du bas). D'après (Pijnenborg, Robertson et al. 1985).

Caractéristiques de chaque type de villosité

Les composants de chaque type de villosité vont varier, et le nom de la villosité sont donnés par sa structure morphologique (Pijnenborg, Robertson et al. 1985) :

- La villosité mésenchymateuse, structure provisoire observée principalement en première partie de grossesse, possède une couche de cytotrophoblastes complète et fournie. La

couche externe de syncytiotrophoblastes possède des noyaux réguliers. Le stroma de la villosité est abondant, lâche, de type immature, et seules quelques cellules de Hofbauer (macrophages d'origine fœtale) sont présentes. Les capillaires fœtaux sont peu développés et peu nombreux.

- La villosité intermédiaire immature, forme majoritaire retrouvée dans les placentas immatures, présente une structure proche de la villosité mésenchymateuse, avec une couche cytotrophoblastique importante, un syncytium parfois dispersé, mais une absence de nœuds syncytiaux (partie où les noyaux sont très regroupés). Le stroma est lâche, moins abondant que dans les villosités mésenchymateuses, les cellules de Hofbauer sont nombreuses. On trouve un réseau vasculaire fœtal complet, avec artérioles/capillaires/veinules, mais qui n'occupe qu'une petite partie de l'axe villositaire.
- La villosité souche, peut être primordiale et dans ce cas connecte l'arbre villositaire à la plaque chorale, mais comprend jusqu'à quatre générations de divisions dichotomiques. Elle sert d'échafaudage à la structure placentaire, et on la retrouve en plus grande proportion dans la partie sous chorale centrale du placenta. Elle est caractérisée par une fibrose stromale autour des vaisseaux fœtaux centraux. Ceci lui donne le rôle de soutien de l'arbre villositaire.
- La villosité intermédiaire mature représente un quart des villosités retrouvées dans les *placentae* matures. Elle n'est retrouvée qu'à partir de la fin du deuxième trimestre. Elle est large (60 à 150 μ m). Les vaisseaux fœtaux représentent la moitié de l'axe villositaire, dans un stroma très lâche. La couche syncytiale est régulière, sans nœuds syncytiaux, les cytotrophoblastes encore bien présents. On n'aperçoit pas encore d'amincissement de la barrière foeto-placentaire (pas de membranes vasculo-syncytiales).
- La villosité terminale est formée par le bourgeonnement terminal de la villosité intermédiaire, formant une structure « en grappe ». Sur une section coronale de l'axe

villositaire, on trouve des capillaires dilatés en sinusoides, occupant presque toute la surface. Les capillaires fœtaux sont au très proche contact de la couche syncytiale car les cytotrophoblastes sont rares. La couche syncytiale est elle-même amincie. Ainsi se trouvent formées les membranes vasculo-syncytiales. Les villosités terminales apparaissent habituellement autour de la 27^{ème} semaine d'aménorrhée (SA). Elles représentent environ 60% des villosités retrouvées dans le placenta à terme.

Au total, l'arbre villositaire se forme par ramification successive, chaque « branche-fille » n'étant pas obligatoirement identique à la « branche-mère ». Un tronc villositaire est constitué de couches concentriques :

- avec bordure extérieure formée de syncytiotrophoblastes,
- couche sous-jacente formée de cytotrophoblastes,
- centre occupé par du stroma de cellularité et de niveau de fibrose variables et
- vascularisation fœtale plus ou moins développée.

Evènements structuraux observés durant le bourgeonnement villositaire précoce

Les zones de bourgeonnement des villosités sont repérées précocement par la présence de « points chauds » (*hot spots* des anglo-saxons). Ces points sont caractérisés par un amas de cellules stromales, dépourvus de canaux stromaux, couverts par des trophoblastes en grand nombre. Dans ces points chauds, l'index de prolifération trophoblastique et stromal est très élevé. Ces points chauds sont présents tout au long de la gestation. Ces zones représentent la première étape du bourgeonnement de la villosité mésenchymateuse. En effet, les trophoblastes post-prolifératifs vont fusionner avec le syncytium adjacent, menant à la formation d'un bourgeon syncytial, appelé « bourgeon trophoblastique ». L'étape suivante est la formation de « bourgeons villositaires », par l'invasion des « bourgeons trophoblastiques » par les trophoblastes et le mésenchyme sous-jacent (Castellucci, Kosanke et al. 2000). Les fibroblastes fœtaux semblent essentiels pour ce bourgeonnement, puisque l'équipe de Kaufmann ne le reproduit qu'en ajoutant du milieu

conditionné de fibroblastes à des sphéroïdes de cellules immortalisées MC1 (dérivées de cellules BeWo, non invasives, proches phénotypiquement des cytotrophoblastes villex) ou après cocultures de MC1 avec des fibroblastes fœtaux (Castellucci, Kosanke et al. 2000).

Mécanismes régissant le développement de l'arbre villositaire

Jusqu'à la mise en place des villosités mésenchymateuses primordiales, le développement placentaire semble régi principalement par les interactions du trophoctoderme avec son environnement. Le reste du développement est intimement lié au développement de la circulation fœtale dans l'axe villositaire. Les arguments sont surtout indirects car les expériences chez l'humain sont impossibles.

Un exemple illustratif est donné par la môle hydatiforme complète. Il s'agit du développement d'un *conceptus* ayant perdu le pronucléus d'origine maternelle et se trouvant diploïde par duplication du pronucléus d'origine paternelle (ou après fécondation par deux spermatozoïdes). Il existe un développement exclusif de « kystes villositaires » aberrants, sans structure vasculaire centrale, de par l'absence d'embryon. Dans cette pathologie, les syncytiotrophoblastes sécrètent des taux très élevés de HCG, mais le développement placentaire n'est pas normal (figure 10). Ceci est en faveur d'une relation étroite entre développement structurel villositaire et développement de la circulation chorio-allantoïdienne.



Figure 10 : image à fort grossissement d'un groupement de kystes trophoblastiques caractéristiques d'une môle hydatiforme.

Les kystes sont pleins de liquide, il n'y a aucune structure vasculaire.

Il existe un brusque changement (*switch* des anglo-saxons) dans le développement de l'arbre villositaire. Jusqu'en fin de deuxième trimestre, l'augmentation des surfaces d'échange se fait par

bourgeonnement. A partir de la formation des villosités intermédiaires matures, il n'y a plus de maturation possible en villosités souches et les villosités « terminent » leurs bourgements pour donner les villosités terminales, unités hautement capillarisées. Le bout final de ces villosités est ainsi le lieu d'échanges materno-fœtaux optimaux via les « membranes vasculo-syncytiales » (figure 23). Les événements régissant ce « switch » ne sont pas bien connus. Différents facteurs, dont l'oxygénation dans la chambre intervillieuse, sont en jeu. Il existe des variations progressives des facteurs de croissance, des facteurs angiogènes, et donc modification des résultantes.

Le maintien de la couche villositaire syncytiale est assuré par la couche sous-jacente de cytotrophoblastes villositaires, considérés par beaucoup d'auteur comme de véritables cellules souches. En effet, leur isolement en culture primaire permet ensuite de les orienter, selon les conditions de culture, vers un de leurs trois destins (figure 3).

Enfin, on observe dans un placenta des zones hétérogènes, composées de parts variables de chaque type de villosité. Dans les placentas issus de grossesses « normales », il n'est pas rare de trouver des zones de villosités mésenchymateuses couvertes de trophoblastes dégénératifs, ou de dépôts de fibrine. Il pourrait s'agir d'un phénomène d'autorégulation, les bourgements excessifs pouvant créer des conditions hémodynamiques défavorables (stase ou turbulence) entraînant la régression des bourgeons.

Envahissement et remodelage des artères spiralées

Jusqu'à ce point de la présentation de la mise en place du placenta, les cytotrophoblastes extravilloux ont à peine été évoqués. Ceux-ci sont développés aux « pieds » des villosités crampons après la cinquième semaine de développement et dépassent la coque trophoblastique. Ils constituent les colonnes extravillositaires. Ils sont issus des cytotrophoblastes villositaires et acquièrent un caractère invasif qui fait leur caractéristique. Ils sont de deux types, les TEV endovasculaires et les TEV interstitiels. Les premiers envahissent les artères spiralées se trouvant dans la *décidua basalis* et progressent jusqu'au tiers supérieur du myomètre. Les deuxièmes

pénètrent profondément la décidue maternelle et se trouvent également présents jusqu'au tiers supérieur du myomètre (figure 11) qu'ils atteignent autour de la 22^{ème} SA.

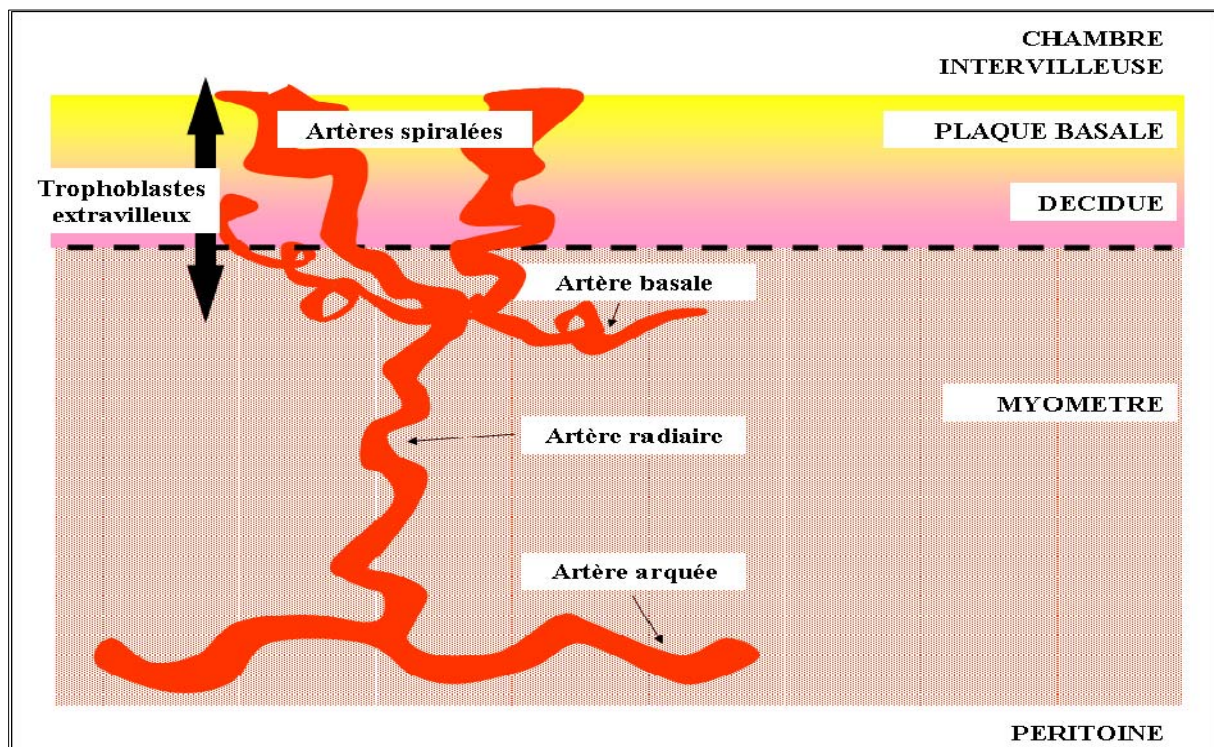


Figure 11 : représentation schématique de la circulation artérielle maternelle dans le myomètre et l'endomètre sus-jacent.

La limite d'envahissement des trophoblastes extravilloux est représentée par la flèche noire.

Afin de « permettre » aux TEV de l'envahir, la décidue maternelle et le myomètre subissent une transformation, appelée « décidualisation ». Le terme est lui-même incorrect, car il vient du latin *decidere* qui veut dire tomber. Il ne devrait s'appliquer qu'à la partie qui se décollera au moment de l'accouchement, soit la décidue et la couche superficielle du myomètre, alors que le phénomène touche toute la vasculature utérine. Il existe une première phase, induite par la progestérone, avec vacuolisation de l'endothélium des artères spiralées et une ballonnisation des cellules musculaires lisses. La deuxième phase, on parle maintenant de « remodelage associé au trophoblaste », comprend une réelle désorganisation de la média, qui intervient quand les trophoblastes interstitiels entourent les artères. C'est seulement après cette deuxième phase qu'apparaissent les trophoblastes endovasculaires. Progressivement, les trophoblastes sont intégrés dans la membrane des artères et subissent un « emballage » dans une couche de fibrose.

C'est ainsi qu'ils remplacent la couche musculaire des artères spiralées qui a disparu. Il existe enfin une réépithélialisation par des cellules endothéliales maternelles. Il existe une controverse pour savoir s'il existe une invasion trophoblastique intravasculaire exclusive ou s'il existe aussi un envahissement par les trophoblastes interstitiels. Il existe un seul marqueur exclusif des trophoblastes endovasculaires à ce jour, le NCAM (Burrows, King et al. 1994), mais aucune étude récente ne vient conclure quant à l'origine intravasculaire exclusive ou interstitielle des trophoblastes participant à l'invasion.

Les trophoblastes endovasculaires migrent à contre-courant dans les artères et ne migrent pas dans les veines. Le pourquoi d'une telle spécificité n'est pas encore connu. Des phénomènes physiques de réorganisation du squelette des TEV en réponse à des forces d'étirement peuvent être soupçonnés comme étant responsable de leur capacité migratoire. Récemment, des expériences effectuées avec des trophoblastes de singe rhésus cultivés dans des capillaires irrigués ont montré que les trophoblastes avaient une migration rétrograde seulement en présence de cellules endothéliales (Soghomonians, Barakat et al. 2005). Par ailleurs, quelques arguments *in vivo* penchent pour une théorie qui inclut le flux dans les événements régissant la migration endovasculaire des TEV. Chez le hamster doré, l'ouverture des canaux artériels intraplacentaires précède l'invasion endovasculaire (Pijnenborg, Robertson et al. 1975). Chez l'humain, l'invasion profonde dans la partie myométriale des TEV n'intervient qu'après la mise en place de la circulation materno-placentaire, entre la 9^{ème} et la 12^{ème} SA. La figure 12 présente les différents sous-types de trophoblastes présents lors du trajet migratoire des TEV dans la décidue puis le myomètre maternel. Le sous-type rencontré le plus loin est formé par des cellules plurinuclées, dont le rôle est mal connu, et qui représenteraient l'étape de différenciation la plus avancée du TEV.

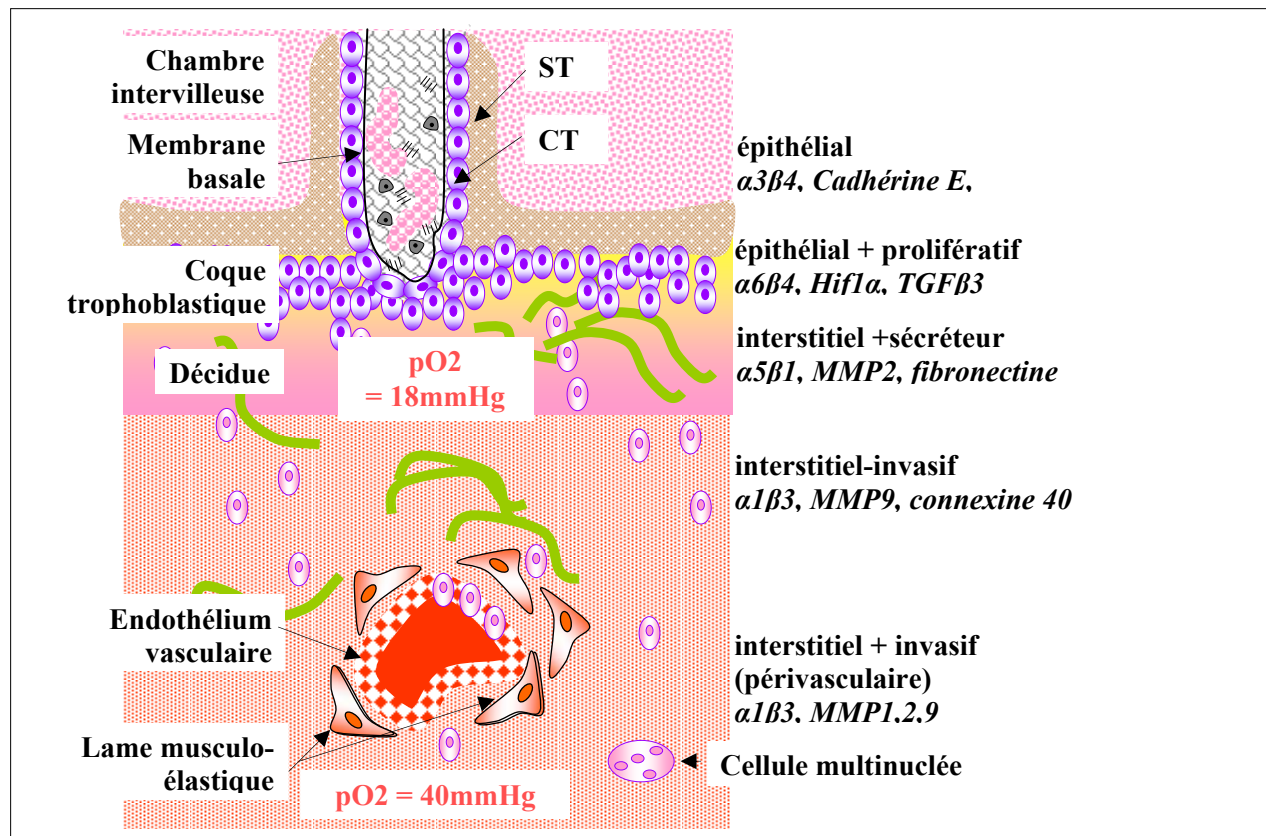


Figure 12 : invasion trophoblastique et modification des intégrines exprimées par les différents sous-types de trophoblastes.

Les cytotrophoblastes extravillous de la base de la villosité crampon vont dissocier la paroi musculo-élastique des artères et remplacer par endroit l'endothélium. Les différentes sous-unités d'intégrines sont notées en italiques selon le type de trophoblaste et leur ligand spécifique, ainsi que les métalloprotéases matricielles mises en jeu (de la surface à la profondeur MMP-2 puis MMP-9), les cytokines, facteurs de transcription ou complexes jonctionnels mis en jeu à chaque niveau d'invasion. D'après (Challier and Uzan 2003).

PLACENTA MURIN

Le placenta de souris est intéressant car non seulement accessible beaucoup plus facilement que le placenta humain à des termes tardifs car la gestation ne dure que 19 à 20 jours, mais également car de nombreuses mutations ciblées et certaines invalidations géniques ont permis de faire de grands progrès dans la compréhension du contrôle du développement placentaire. Le placenta murin mature, comme le placenta humain, est le siège d'une circulation foeto-maternelle hémochoriale. Mais, cette circulation est dite hémotrichoriale chez la souris, car les hématies maternelles sont séparées des hématies fœtales par trois couches de trophoblastes, alors qu'elle n'est qu'hémo-monochoriale chez l'humain. De plus, les phénomènes d'invasion trophoblastique sont moins prononcés chez la souris, les trophoblastes n'envahissant que très rarement le myomètre maternel.

Cependant, le placenta murin présente de nombreuses similitudes avec le placenta humain, que nous allons détailler. Nous ne présentons que brièvement les phases précoces d'implantation et ne décrivons la structure placentaire qu'à partir du 9,5^{ème} jour post-coïtal (jpc), date à laquelle la dissection sous loupe binoculaire devient possible (sinon aisée).

La couche trophoblastique du placenta provient, comme chez tous les embryons de mammifères, de la première couche à se différencier, la couche externe du blastocyste, le trophectoderme. A 4,5 jpc, l'implantation a lieu, et l'on distingue une évolution différente pour le trophectoderme selon qu'il borde la masse cellulaire interne, où il continue à proliférer et va former l'ectoderme extra-embryonnaire et le cône ectoplacentaire, ou qu'il se trouve à l'opposé, et va stopper sa division mais continuer son endoréplication et donner lieu à une première couche de cellules géantes, qui vont circonscrire la zone de développement du *conceptus*.

Le développement se poursuivant, l'ectoderme extra-embryonnaire va s'étendre et former l'épithélium chorionique. L'allantoïde va se développer à partir du mésoderme à l'extrémité postérieure de l'embryon. Au 8,5^{ème} jpc, l'allantoïde entre en contact avec le chorion. Très

rapidement, des replis allantoïdiens apparaissent, qui s'invaginent dans le chorion. Ils seront le lieu de mise en place des vaisseaux fœtaux (Rossant and Cross 2001).

Le placenta murin à 9,5 jpc, début du labyrinthe

A cette date, l'embryon possède environ 15 à 20 somites, le cordon ombilical est individualisé et l'allantoïde a déjà établi sa fusion avec le chorion. On distingue alors ce qui deviendra la zone d'échanges foeto-maternels, *ie* le labyrinthe, peu développé à ce stade. Le labyrinthe est bordé par une couche de cellules géantes, dérivées du zygote, et qui délimitent l'espace entre la décidue maternelle et le labyrinthe (voir figure 13).

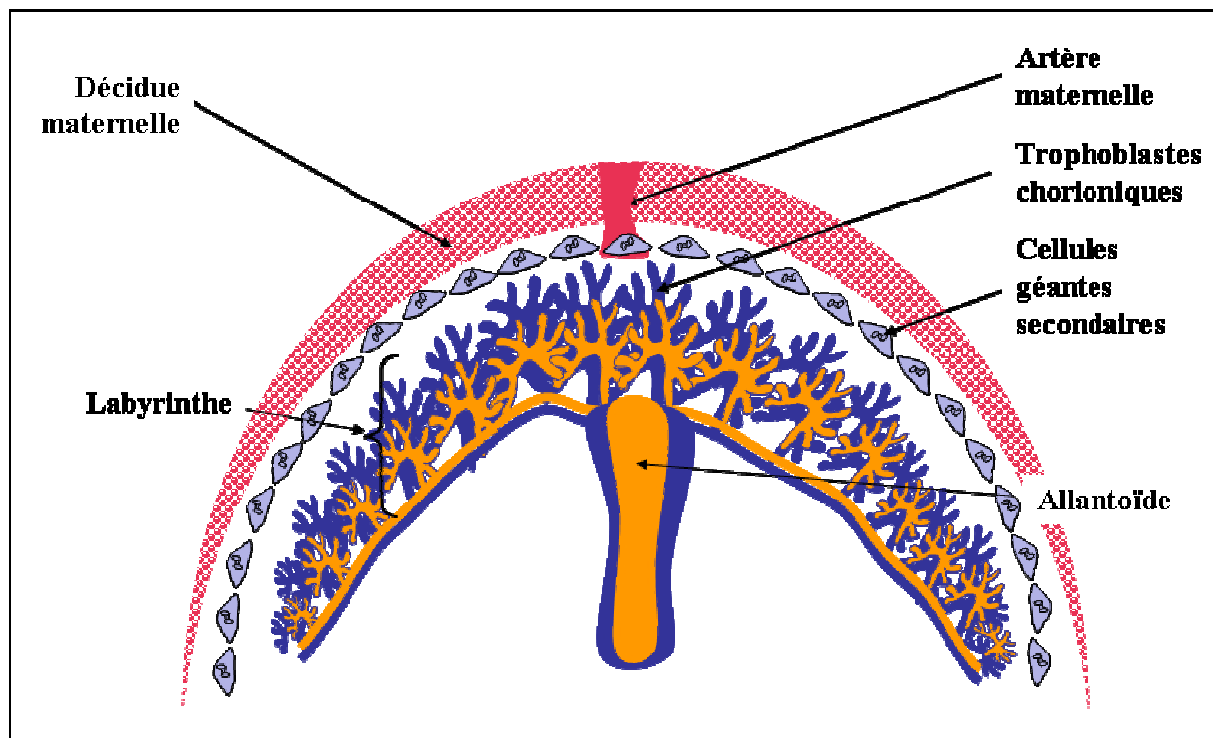


Figure 13 : représentation schématique du développement du labyrinthe murin à 9,5 jpc.

L'allantoïde a fusionné avec le chorion, des invaginations s'y sont développées et le début des interconnections entre les villosités se fait. La couche de cellules géantes secondaires est présente à l'interface materno-chorionique. D'après (Rossant and Cross 2001).

Le placenta murin mature, à 11,5 jpc

Le labyrinthe continue sa croissance, les expansions allantoïdiennes « poussant » les cytotrophoblastes vers le versant maternel. Une nouvelle zone apparaît, la zone de jonction, ou *trophospongium*. Dans cette zone, l'artère maternelle, souvent centrale, et ses branches, sont

transformées par la présence de trophoblastes endovasculaires. La couche de cellules géantes trophoblastiques est toujours présente, avant la décidue maternelle. Au sein du labyrinthe, les sinus sanguins sont baignés par le sang maternel à 10,5 jpc alors qu'ils ne sont pas vus à 9,5jpc. Les vaisseaux sanguins fœtaux sont absents à 10,5jpc mais toujours vus à 12,5 jpc. C'est pour cette raison que l'on pense que le placenta murin devient fonctionnel autour du 11,5^{ème} jpc.

Le placenta murin de 13,5 jpc à terme

C'est à ce terme-là qu'apparaissent des cellules particulières, d'origine zygotique, les cellules à glycogène. Leur rôle est mal connu ; elles proviennent des spongiotrophoblastes et vont progresser à travers la décidue maternelle, se regroupant autour de l'artère centrale. L'invasion déciduale par ces cellules est complète à 18,5 jpc, mais les cellules à glycogène n'envahissent jamais le myomètre (figure 14). A partir du 15,5 jpc, le labyrinthe croît plus lentement, ne gagnant que 15% de poids supplémentaire. Pendant ce temps, le gain de poids fœtal est de plus de 100%.

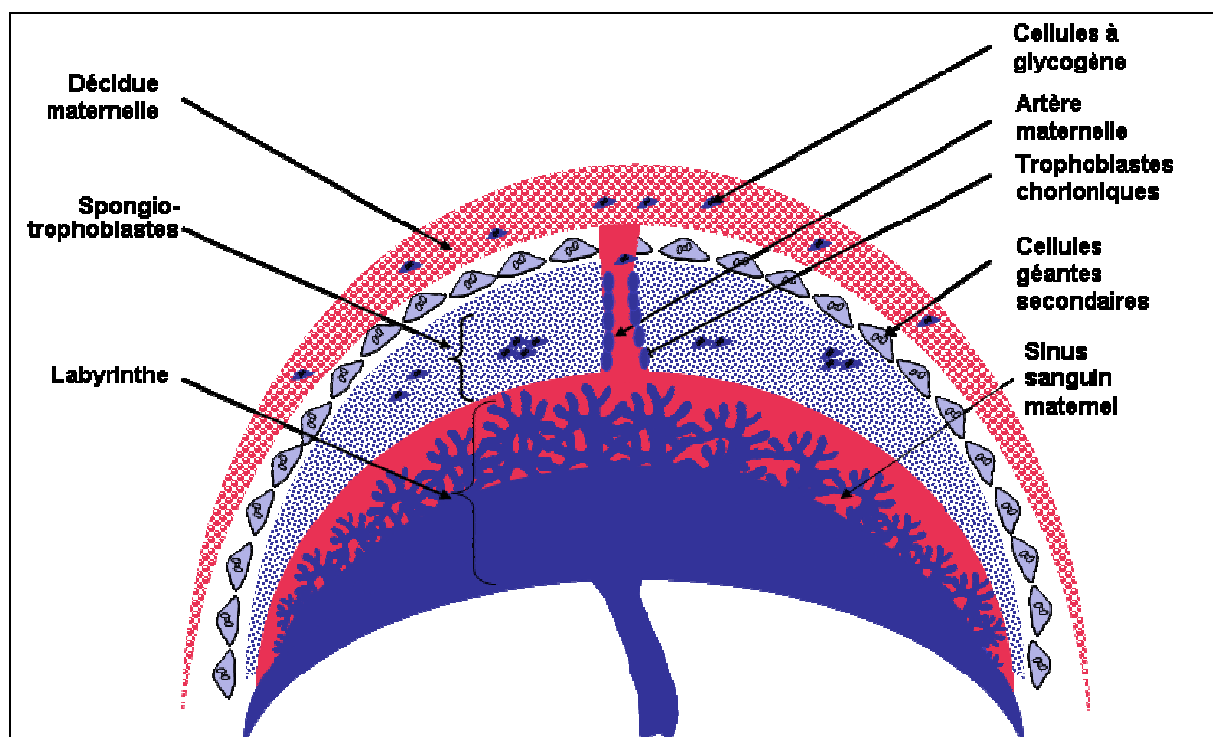


Figure 14 : structure schématisée du placenta murin à terme. A noter que seule la partie se trouvant dans le trophospongium de l'artère maternelle est envahie par des trophoblastes endovasculaires. A noter également que l'on trouve des îlots de cellules à glycogène dans le *trophospongium*. Pour des raisons de clarté, le *trophospongium* est encore nettement représenté, mais sa proportion diminue à terme.

Fonctionnement endocrinien de l'unité materno-foeto-placentaire murine

A la différence de ce qui se passe chez l'humain, le placenta murin ne prendra jamais le relais du corps jaune ovarien au cours de la gestation. Ainsi, l'ovariectomie à tous les stades de la gestation va provoquer une perte embryonnaire chez la souris. C'est donc le corps jaune qui doit sécréter la progestérone tout au long de la gestation. Cette sécrétion est d'abord entretenue par la sécrétion hypophysaire d'hormone lactogène. A partir du 11^{ème} jpc, les cellules géantes secondaires du placenta vont sécréter l'hormone placentaire lactogène (de type I puis II) et stimuler la production de progestérone par le corps jaune. De plus, les hormones de la stéroïdogénèse, bien que retrouvées dans le placenta murin à un stade précoce, ne sont plus présentes ensuite (Ben-Zimra, Koler et al. 2002). Enfin, il n'a pas été retrouvé de gène pour la chaîne β de l'hormone chorionique gonadotrophique chez la souris.

Comparaison du placenta humain et murin

Je présente ici principalement le travail de P. georgiades *et al*, à Cambridge, qui me semble présenter très simplement les éléments d'anatomie descriptive comparative (Georgiades, Ferguson-Smith et al. 2002).

Sites des échanges foeto-maternels

Les échanges foeto-maternels se font chez l'humain dans le placenta appelé « placenta foetal » compris entre la plaque choriale et la plaque basale et chez la souris dans la partie appelée labyrinthe. Ces deux régions contiennent toutes deux les vaisseaux fœtaux et les espaces baignés par le sang maternel, les deux entités étant séparées par des couches cellulaires dérivées du zygote. Les deux circulations vont pouvoir effectuer les échanges nécessaires au bon déroulement de la grossesse. Dans les deux espèces, les volumes d'échange sont discoïdes, même si chez l'humain le « disque » est formé de plusieurs cotylédons. La surface fœtale, centrée par le cordon ombilical est plate, alors que la surface maternelle est convexe et irrégulière.

La zone intermédiaire entre zone d'échange et tissus maternels

Chez l'humain, la région bordant la surface maternelle du « placenta fœtal » est appelée la plaque basale. Elle est représentée par les cellules trophoblastiques permettant l'ancrage du placenta dans la décidue maternelle, et les tissus maternels composant la caduque basilaire. Chez la souris, la région bordant la surface maternelle du labyrinthe est composée de spongiotrophoblastes formant la zone jonctionnelle. Elle n'apparaît qu'à partir du 11,5^{ème} jpc. Elle est limitée versant maternel par une couche de cellules géantes secondaires. Dans les deux espèces, on ne trouve jamais dans ces zones intermédiaires de vaisseaux sanguins fœtaux. Par contre, les vaisseaux sanguins artériels maternels s'y trouvent, et des trophoblastes les envahissent sur cette portion.

Envahissement placentaire au delà de la zone jonctionnelle ou de la plaque basale

Chez l'humain, après une première « vague » d'invasion interstitielle et endovasculaire superficielle qui aboutit à la création de la coque trophoblastique, une deuxième « vague » d'invasion va avoir lieu de la 8^{ème} à la 22^{ème} SA, interstitielle et aussi endovasculaire. Les TEV responsables de celle-ci se retrouveront jusqu'au tiers supérieur du myomètre. Au moment de la naissance, le placenta se clivera pourtant dans la plaque basale, entre la couche compacte et la couche spongieuse de la caduque basilaire. Chez la souris, au delà la couche de cellules géantes secondaires, vont apparaître tardivement les cellules à glycogène, qui envahiront la *décidua basalis* mais pas le myomètre. De même dans cette zone, les artères maternelles ne sont pas envahies par les trophoblastes. Ainsi, on peut rapprocher ces cellules à glycogène des TEV humains interstitiels qui participent à la deuxième phase d'invasion.

La figure 15 récapitule les trois zones chez l'homme et chez la souris et met ces zones en correspondance. Ceci permet de dégager deux différences clés entre le placenta humain et murin :

- d'une part la structure des zones d'échange est différente, arborisation chez l'homme, structure labyrinthique chez la souris,

- d'autre part, l'envahissement des artères maternelles est plus limité chez la souris, s'arrêtant au *trophospongium*.

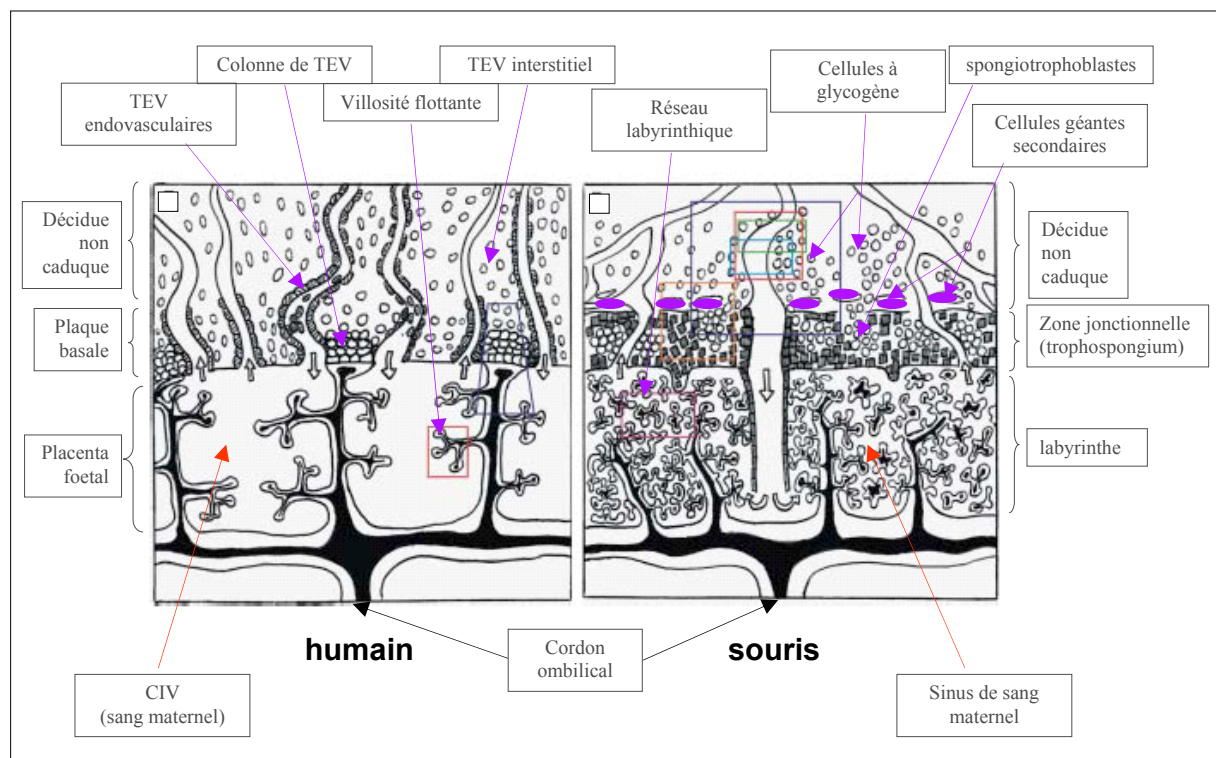


Figure 15 : représentation schématique comparative des placentas humain et murin.

La face fœtale se trouve du côté du cordon ombilical. CIV = chambre intervillieuse, TEV = trophoblaste extravillieux, sans distinction. D'après (Georgiades, Ferguson-Smith et al. 2002)

Comparaison des barrières hémochoriales entre l'humain et la souris

Comme nous l'avons signalé plus haut, la structure des zones d'échange foeto-maternelles est hémomonochoriale pour l'humain et hémotrichoriale chez la souris. Mais ces deux zones sont analogues sur le plan fonctionnel, puisque le sang fœtal et maternel y circulent de façon proche. Dans les deux espèces, la couche la plus externe des villosités chorioniques est constituée de trophoblastes, tandis que le centre des villosités est formé de mésenchyme allantoïdien et de vaisseaux en continuité avec ceux du cordon ombilical. Ainsi, les deux *placentae* sont de type chorio-allantoïdien. Le placenta humain est constitué d'une multitude de villosités aux extrémités borgnes, alors que dans le placenta murin les projections chorioniques sont beaucoup plus interconnectées, réalisant un vrai labyrinthe. Sur le plan circulatoire, le sang maternel circule

beaucoup plus librement dans la chambre intervillieuse humaine que dans les sinus sanguins de la souris.

Chez l'humain, les échanges entre les circulations fœtale et maternelle se font à travers :

- la couche syncytiale, monocouche de cellules trophoblastiques rassemblées à l'intérieur d'une même membrane, directement en contact avec le sang maternel, dont le pôle apical comporte de nombreuses microvillosités,
- une membrane basale, attachée de façon lâche à la couche syncytiale,
- une couche disparaissant au cours de la grossesse, constituée de cytotrophoblastes vilieux,
- le centre de la villosité, comprenant le plus souvent de la matrice extra-cellulaire et des péricytes,
- une membrane basale attachée aux cellules endothéliales fœtales,
- les cellules endothéliales des capillaires fœtaux, au centre desquelles le sang fœtal circule.

La figure 16 présente schématiquement les zones d'échange du placenta humain.

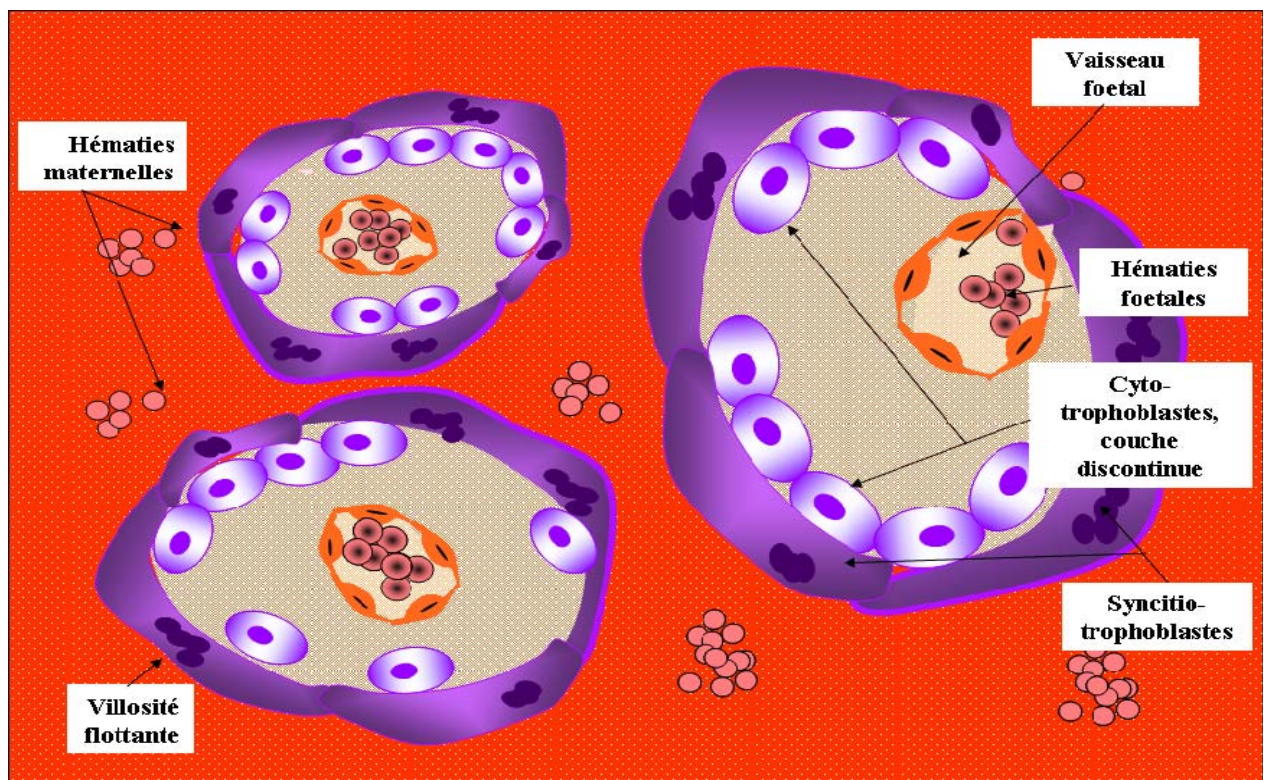


Figure 16 : représentation schématique d'une coupe de placenta humain à terme.

Les hématies maternelles circulant librement dans la chambre intervillieuse. Les membranes basales bordant la couche syncytiale et l'endothélium fœtal n'ont pas été représentées.

Chez la souris, l'interface trophoblastique entre la circulation maternelle et fœtale est composée de trois couches. Ainsi, les deux circulations se trouvent séparées par :

- la couche discontinue de cellules trophoblastiques mono-nuclées, en contact direct avec le sang maternel, ne possédant pas de microvillosités,
- la couche trophoblastique moyenne et la couche interne (couche II et III respectivement), qui sont toutes deux syncytiales. La surface maternelle de la couche moyenne est attachée de façon lâche à la première couche et présente des invaginations irrégulières créant des espaces entre elle-même et la première couche. Ainsi, le couche II peut également être en contact direct avec le sang maternel
- une membrane basale entre la couche III et l'endothélium des vaisseaux fœtaux, à la différence de ce qui se passe chez l'humain, où les vaisseaux fœtaux ont leur propre membrane basale. La figure 17 représente schématiquement la zone d'échange, labyrinthe, du placenta de souris.

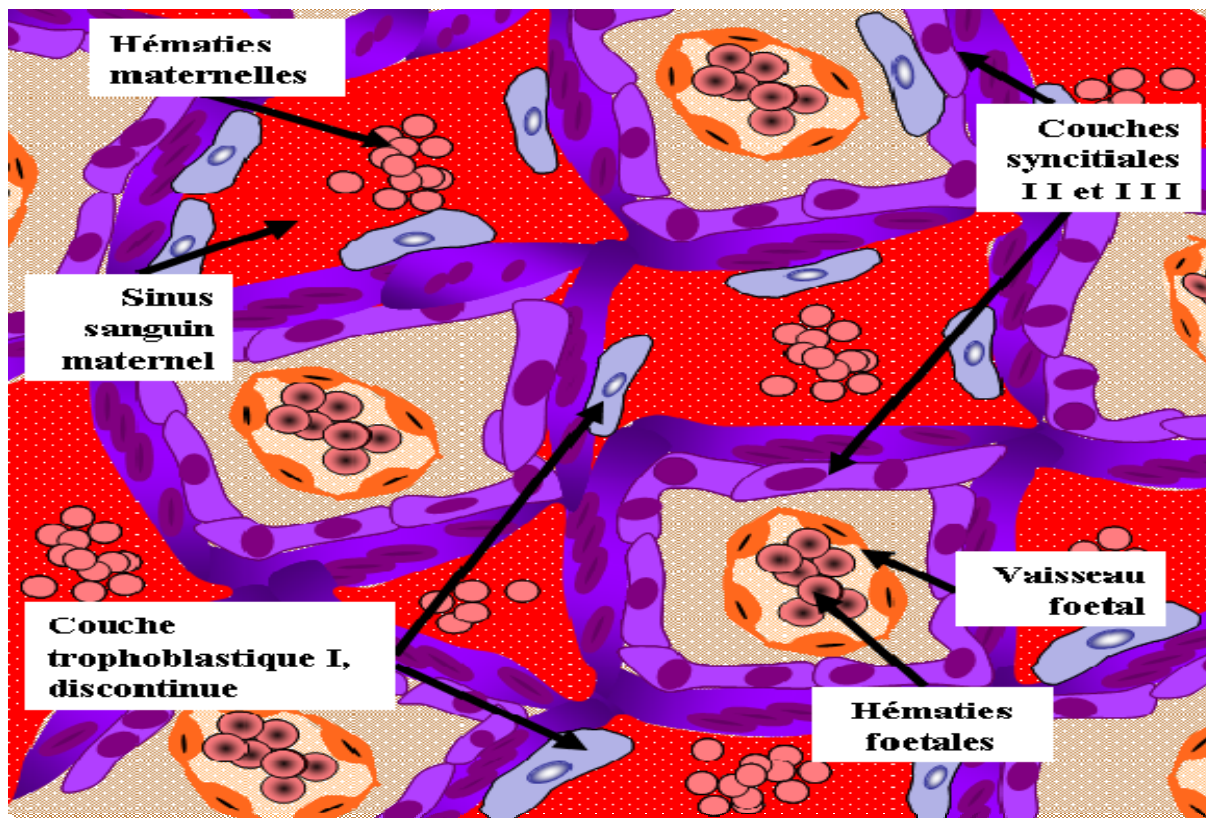


Figure 17 : représentation schématique d'une coupe de placenta murin, passant par le labyrinthe.

Vaisseaux fœtaux et villosités chorioniques sont beaucoup plus imbriqués dans la réalité et de ce fait, la membrane basale séparant la couche syncytiale III et l'endothélium fœtal n'a pas pu être représentée. D'après (Rossant and Cross 2001).

L'ANGIOGENESE PLACENTAIRE

Acteurs principaux de la morphogenèse vasculaire

Afin que l'oxygène diffuse efficacement dans toutes les cellules d'un organisme, un grand nombre d'espèces vivantes, en particulier les mammifères homéothermes, a développé un transporteur moléculaire de l'oxygène, l'hémoglobine, présente dans les globules rouges, et un réseau complexe de transport, l'arbre vasculaire.

Dès le XIII^{ème} siècle, Ibn Al-Nafis entrevoit le rôle essentiel du poumon dans « l'épuration » du sang. Mais l'oxygène ne fut découvert que bien plus tard, entre 1771 et 1775, par plusieurs chimistes indépendants. Le rôle de l'oxygène lui-même sur la création des vaisseaux ne sera entrevu que bien plus tardivement, à la fin du XX^{ème} siècle.

Les circulations fœtale et maternelle ont été considérées comme étant en contact direct jusqu'à la fin du XVIII^{ème} siècle. Ce n'est qu'en 1754 que John Hunter a injecté de la cire dans l'artère utérine, et ne l'a retrouvée que dans la chambre intervillieuse, pas dans la circulation fœtale. Mais les progrès dans la compréhension de la physiologie de la circulation foeto-maternelle sont principalement intervenus au cours du XX^{ème} siècle.

Enfin, la meilleure compréhension de la mise en place des réseaux vasculaires, et des mécanismes moléculaires mis en jeu, avec la découverte du VEGF, facteur fondamental d'angiogenèse, permet d'avoir une vision plus précise de la mise en place et de l'adaptation continue de la circulation materno-fœtale.

Les mécanismes moléculaires qui régissent la vasculogenèse et l'angiogenèse sont complexes, mettant en jeu des signaux extra- et intracellulaires, un équilibre entre facteurs pro- et anti-angiogènes, un effet du milieu environnant dont la résultante donnera des vaisseaux spécifiques à chaque organe, dont l'endothélium pourra avoir différents types (fenestré, continu, discontinu) et dont la réactivité sera adaptée (haute résistance, basse résistance). Ainsi, la maturation organotypique permet une adaptation fine de la vascularisation aux différents besoins des organes.

La création d'un système vasculaire compétent dépend d'un équilibre précis entre facteurs pro et anti-angiogéniques. Mais il existe seulement quelques facteurs angiogènes connus pour être spécifiques de l'endothélium vasculaire, comme ceci a été prouvé par des expériences d'inactivation génique. Le plus connu de ces facteurs angiogènes spécifiques de l'endothélium est le VEGF (*vascular endothelial growth factor*). Le système tie/angiopoïétines est également spécifique des cellules endothéliales. Le système Eph/éphrines a également une action sur les cellules endothéliales, nécessaire à l'établissement du réseau vasculaire, même si il a d'abord été mis en évidence pour son rôle dans la guidance axonale. Il existe par ailleurs de très nombreuses cytokines qui vont intervenir dans la régulation de l'angiogenèse, sans que leur rôle soit spécifique de l'endothélium. C'est le cas de nombreux facteurs de croissance, d'immunocytokines et de certains métabolites produits dans la matrice extracellulaire (Collo and Pepper 1999). La composition de la matrice extracellulaire où sont stockés ces composants, va en elle-même être un régulateur de la réponse endothéliale. De même, la mobilité et la morphogenèse des cellules endothéliales sont régulées par une activation contrôlée dans le temps et dans l'espace des récepteurs aux intégrines et des intégrines elles-mêmes par les acteurs de la mise en place du système vasculaire. Enfin, les réponses des cellules endothéliales vont modifier leur environnement, par l'expression d'enzymes protéolytiques (métalloprotéinases matricielles ou Matricial Metallo Peptidase –MMP).

La famille du VEGF et de ses récepteurs

La cytokine la plus étudiée impliquée dans la régulation positive de l'angiogenèse appartient à la famille du VEGF, c'est le VEGF-A.

La famille du VEGF et celle de ses récepteurs sont des molécules clés de l'angiogenèse. Elles interviennent dans la phase d'initiation de l'angiogenèse et la régulation de la perméabilité capillaire (Takahashi and Shibuya 2005).

Il existe plusieurs récepteurs au VEGF. Tous appartiennent à la grande famille des récepteurs à activité tyrosine kinase. Nous ne citons que les récepteurs nous intéressant pour leur implication dans la vasculo- et l'angiogenèse.

VEGFR-2 (aussi appelé Flk-1 pour *fetal liver kinase-1*) médie la plupart des signaux de croissance et de survie endothéliales. VEGFR-1, (appelé également Flt-1 pour *Fms-like tyrosine [kinase]-1*) en revanche, semble surtout impliqué dans les conditions pathologiques telles que le cancer, l'ischémie et l'inflammation. Il existe une forme soluble circulante du VEGFR-1, appelée sFlt-1, qui agit comme un antagoniste de l'action du VEGF. Deux autres glycoprotéines de surface, de la famille des récepteurs aux sémaphorines, neuropiline-1 (NRP-1) et NRP-2 sont également des récepteurs pour certains membres de la famille du VEGF. Leur partie intracytoplasmique est très courte, elles ont initialement été impliquées dans la guidance neuronale.

Un schéma des différentes liaisons des membres de la famille du VEGF à ses différents récepteurs est présenté figure 18.

La famille du VEGF comprend :

- VEGF-A, qui a au moins neuf sous-types liés à l'épissage alternatif d'un même gène. L'isoforme VEGF-A₁₆₅ a un rôle prépondérant dans le développement vasculaire, mais chaque isoforme a un rôle précis et spécifique. Le VEGF-A se lie et active deux récepteurs tyrosine-kinase, le VEGFR-1 et le VEGFR-2. VEGF-A, glycoprotéine dimérique, a deux actions biologiques majeures, d'abord en stimulant la prolifération des cellules endothéliales vasculaires, et aussi en augmentant la perméabilité vasculaire. Il promeut aussi la migration et la survie des cellules endothéliales.
- PlGF (*placenta growth factor*), découvert en 1991 dans le placenta humain à tous les stades de la gestation, puis trouvé ultérieurement dans le coeur, le poumon, la glande thyroïde et le muscle squelettique. Il possède quatre isoformes résultant d'un épissage alternatif également, chacune ayant des propriétés spécifiques. PlGF ne se lie qu'à

VEGFR-1 et NRP-1 et -2 pour certaines isoformes. Chez la souris PlGF^{-/-}, il n'existe pas de défaut de l'angiogenèse mais un défaut dans les réponses à l'ischémie, l'inflammation, la cicatrisation et le cancer, soulignant le rôle du VEGFR-1 principalement dans ces processus. Il a été montré que la fixation du PlGF sur VEGFR-1 induisait une phosphorylation de VEGFR-2, potentialisant l'angiogenèse induite par VEGF et que de plus l'hétérodimère VEGF/PlGF induisait une hétérodimérisation des récepteurs VEGFR-1 et -2, potentialisant également l'effet du VEGF (Autiero, Waltenberger et al. 2003)

- VEGF-B, qui possède deux isoformes issues d'épissage alternatif d'un même gène. Il est ubiquitaire mais présent en grande quantité dans le cœur et le muscle squelettique. Son rôle dans l'angiogenèse est controversé, deux équipes trouvant des résultats différents avec des souris VEGF-B^{-/-}.
- VEGF-C et VEGF-D : ils sont sécrétés sous la forme de pré-pro-protéines, et des digestions successives modifient leur affinité pour différents récepteurs. VEGF-C est un facteur paracrine important pour la lymphangiogenèse, et VEGF-D semble impliqué dans l'apparition de capillaires lymphatiques péritumoraux et le développement métastatique (Stacker, Caesar et al. 2001)
- VEGF-E, protéine virale, mais qui semble aussi puissant que VEGF-A₁₆₅ pour promouvoir la prolifération de cellules endothéliales, bien que manquant d'un site basique de fixation à l'héparine

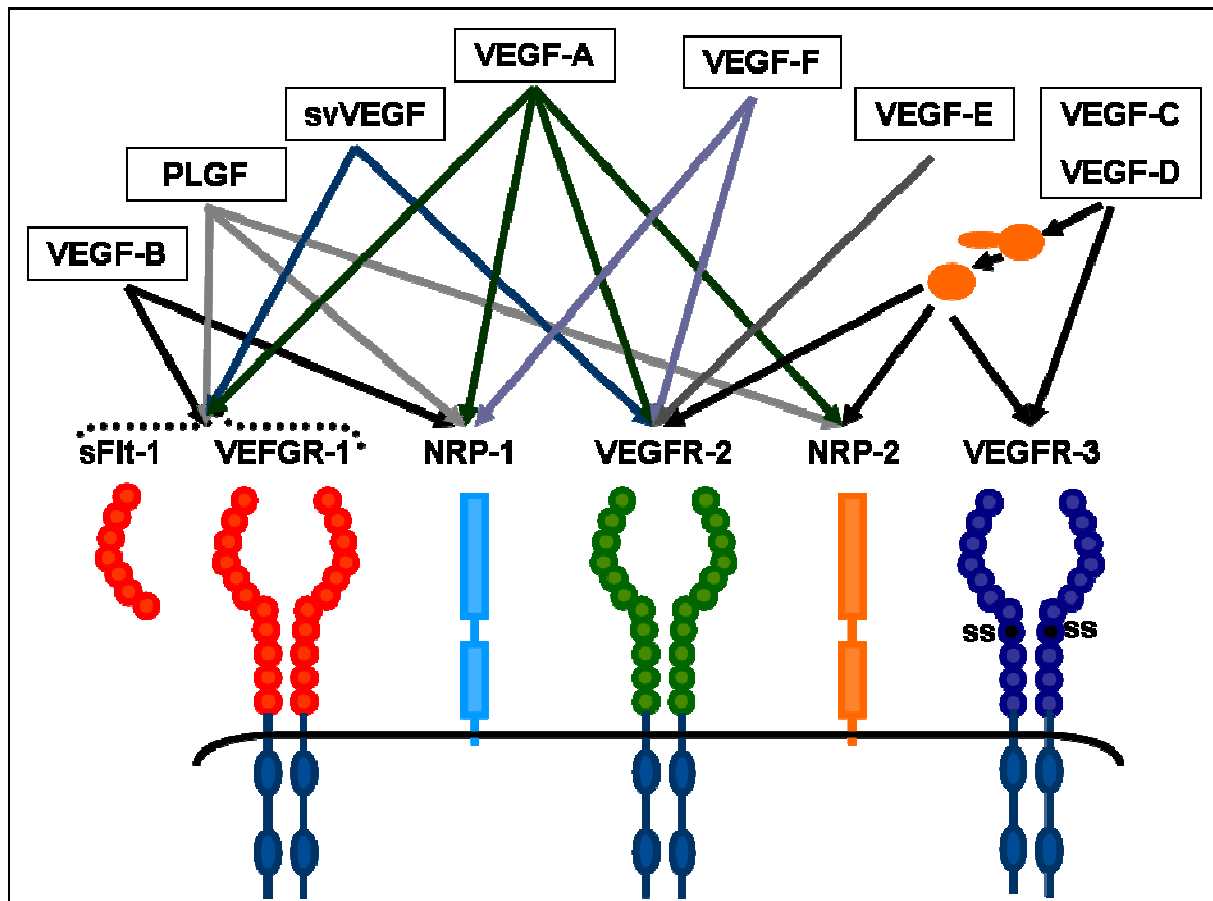


Figure 18 : représentation schématique des liaisons des membres de la famille du VEGF à leurs différents récepteurs
d'après (Takahashi and Shibuya 2005).

Les angiopoïétines et leurs récepteurs

Les récepteurs des angiopoïétines forment une famille à part de récepteurs tyrosine-kinases. Ils sont au nombre de 2, Tie -1 (*Tyrosine kinase with Immunoglobulin-like and EGF-like domains 1* ou *tunica interna endothelial cell-kinase 1*) et Tie-2. Celui dont l'action est la mieux connue est le récepteur Tie-2. Ils sont principalement exprimés par les cellules endothéliales.

Les angiopoïétines sont les ligands du récepteur Tie-2. Elles forment une famille de facteurs de croissance à part, et sont au nombre de 4, nommées Ang-1 à Ang-4.

Ang-1 par sa liaison à Tie-2 promeut l'intégrité structurale des vaisseaux par recrutement d'un support périvasculaire comme celui formé par les péricytes (Papapetropoulos, Garcia-Cardena et al. 1999). Ang-2 en revanche agit comme un antagoniste, il est un agent déstabilisant des parois vasculaires et promeut soit la croissance par bourgeonnement, soit la régression des vaisseaux,

selon l'environnement cellulaire (Maisonpierre, Suri et al. 1997). Ainsi, en présence d'un haut niveau de VEGF-A, Ang-2 va favoriser la croissance vasculaire après déstabilisation (Holash, Wiegand et al. 1999).

Les rôles de Ang-3 et -4 sont moins connus, mais dépendent également du contexte cellulaire, pouvant selon les cas être agonistes ou antagonistes.

Les souris déficientes pour le gène de Ang-1 ou Tie-2 démontrent un phénotype létal causé par un défaut sévère de la vascularisation fœtale (Suri, Jones et al. 1996), (Patan 1998). Au contraire, la surexpression par transgénèse de Ang-2 cause un arrêt de la formation des vaisseaux (Maisonpierre, Suri et al. 1997).

Le système Eph/Ephrines

Les récepteurs de ce système, appelés Eph pour Erythropoïetin-Producing human Hepatocellular carcinoma cell line, ont été découverts comme des récepteurs tyrosine-kinases impliqués dans la guidance neuronale. Il existe 15 récepteurs dans ce système, répartis en deux groupes :

- les récepteurs de type A, EphA, au nombre de 6, et qui partagent une liaison avec un ligand lié à la membrane par une queue glycosylphosphatidylinositol (GPI)
- les récepteurs de type B, au nombre de 9, et qui partagent une liaison avec un ligand possédant un domaine transmembranaire.

Les ligands sont donc de deux types :

- les éphrines-A, au nombre de 6, qui sont ancrées à la membrane par une queue GPI
- les éphrines-B, au nombre de 3, qui se lient à la membrane par un domaine transmembranaire.

Ce sont les *Knock Out* (KO) murins de Ephrine-B2 et de EphB4 qui ont permis de mettre en évidence le rôle prépondérant de ce système dans la mise en place du système vasculaire embryonnaire. En effet, les deux phénotypes sont létaux, par défaut de la différenciation artérioveineuse (Adams, Wilkinson et al. 1999), (Gerety, Wang et al. 1999).

Ce système Eph/Ephrines est impliqué dans les dialogues cellules/cellules à de nombreux niveaux, son rôle dans l'angiogenèse et la progression tumorale a été précisé récemment dans la revue de Héroult *et al* (Heroult, Schaffner et al. 2006).

Les molécules d'adhérence et la matrice extra-cellulaire

Les molécules d'adhérence sont un lien entre les cellules et leur environnement. Elles permettent aux cellules de « sentir » le contexte dans lequel elles se trouvent. Elles ont dans la vasculo- et l'angiogenèse un rôle primordial. En effet, les cellules impliquées, et en premier lieu les cellules endothéliales doivent se déplacer et migrer avant de s'organiser. Au cours de ces événements, une désorganisation de la cohérence cellulaire doit avoir lieu, qui va permettre l'expression d'autres types de protéines d'adhérence, et d'autres récepteurs à ces protéines.

Les sélectines, et plus particulièrement la sélectine-L, ont un rôle à part. La sélectine-L médie l'adhérence des leucocytes à l'endothélium vasculaire activé, et permet le phénomène d'extravasation, qui mène les leucocytes vers le site de l'inflammation.

La matrice extra-cellulaire (MEC) assure un support aux cellules dans l'organisme. Sa structure est dynamique et elle se modifie par remodelage (qui nécessite de nouvelles synthèses protéiques) ou réorganisation, en fonction des différents événements physiologiques ou pathologiques. Les protéines de la MEC – fibronectine, vitronectine, fibrinogène, laminine par exemple - vont agir par différentes liaisons avec les récepteurs transmembranaires cellulaires, dont les hétérodimères d'intégrines. Les récepteurs sont ainsi capables de transmettre des signaux de la MEC vers le noyau des cellules.

L'espace extracellulaire est composé d'un réseau dense et complexe, associant fibres et fibrilles et diverses molécules régulatrices. Dans les phénomènes d'angiogenèse, la MEC doit être dégradée, pour libérer un espace permettant aux cellules endothéliales de migrer et également pour libérer certains facteurs de croissance comme le FGF ou le VEGF. La dégradation de la MEC implique une série de MMPs.

Les MMPs sont une famille d'enzymes, dont la propriété est dépendante d'un atome de zinc. Elles sont classées en deux groupes :

- les MMPs sécrétées, qui comprennent les collagénases (MMP-1, MMP-8 et MMP-13), les gélatinases (gélatinase A = MMP-2 et gélatinase B = MMP-9), les stromélysines (stromélysine-1 = MMP-3, stromélysine-2 = MMP-10, stromélysine-3 = MMP-11) et les autres MMPs (MMP-7 et MMP-12)
- les MMPs associées à la membrane (MT-MMP pour *membrane type*-MMP). Il y a 5 MT-MMP identifiées (MMP-14, 15, 16, 17 et 21).

Les MMPs sécrétées le sont sous forme de pro-enzymes (zymogènes) dont l'activation a lieu dans la MEC ou au contact de la membrane plasmique.

En plus de la régulation de l'activation des zymogènes, une régulation de l'activité protéolytique est assurée par des inhibiteurs tissulaires des MMP, les TIMPs (*Tissue Inhibitor of MetalloPeptidase*). Les TIMPs se complexent de façon irréversible avec les MMPs sécrétées, les rendant inactives. Ainsi, la protéolyse matricielle est équilibrée et contrôlée spatialement grâce à des inhibiteurs de protéases mais aussi par un rétro-contrôle exercé par les fragments protéolytiques formés lors de la dégradation de la MEC.

Les MMPs les plus étudiées dans le phénomène d'angiogenèse sont les gélatinases. La MMP-2 participe à la dégradation de la membrane basale du vaisseau, puis la MMP-9 lyse les fibres d'élastine et permet la migration des cellules endothéliales.

HIF-1 et la régulation des facteurs angiogènes par l'hypoxie

Le facteur HIF-1, ou *Hypoxia Inducible Factor-1*, est un facteur de transcription dimérique formé de deux sous-unités, *alpha* et *béta*. Ce facteur coordonne l'induction de plusieurs gènes impliqués dans la réponse à l'hypoxie. Il se trouve au centre de la régulation de l'angiogenèse. En effet, le stress hypoxique, via le HIF-1, va être une clé des phénomènes d'adaptation tant physiologiques,

comme dans le développement de la circulation materno-fetale ou la réponse à l'altitude, et que pathologiques, comme dans la vascularisation tumorale.

Il était connu que l'altitude induisait une stimulation de l'érythropoïèse. Après que l'érythropoïétine ait été découverte, un élément de réponse à l'hypoxie (*Hypoxia Responsive Element* ou HRE) a été mis en évidence dans son promoteur, fixant le complexe HIF-1. Sa sous-unité *béta*, HIF-1 β , a été identifiée comme étant le facteur ARNT1 (*Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*), protéine déjà connue et participant à la détoxification cellulaire. La sous-unité *alpha*, HIF-1 α , est elle spécifique de la réponse hypoxique. HIF-1 α est très instable en normoxie, elle fixe la protéine de Von Hippel Lindau, pVHL, après hydroxylation d'une proline dépendant de l'oxygène et du fer. pVHL possède une activité ubiquitine ligase et HIF-1 α va finalement être ubiquitinylé et dégradé dans la voie du protéasome. En hypoxie, HIF-1 α n'est plus hydroxylé, va subir une translocation nucléaire et s'associer à HIF-1 β – ainsi qu'à d'autres cofacteurs - pour activer des gènes sous la dépendance d'HRE (Berra, Ginouves et al. 2006). Ce mécanisme est particulièrement important dans la régulation de l'expression du VEGF en réponse au degré d'oxygénation du milieu.

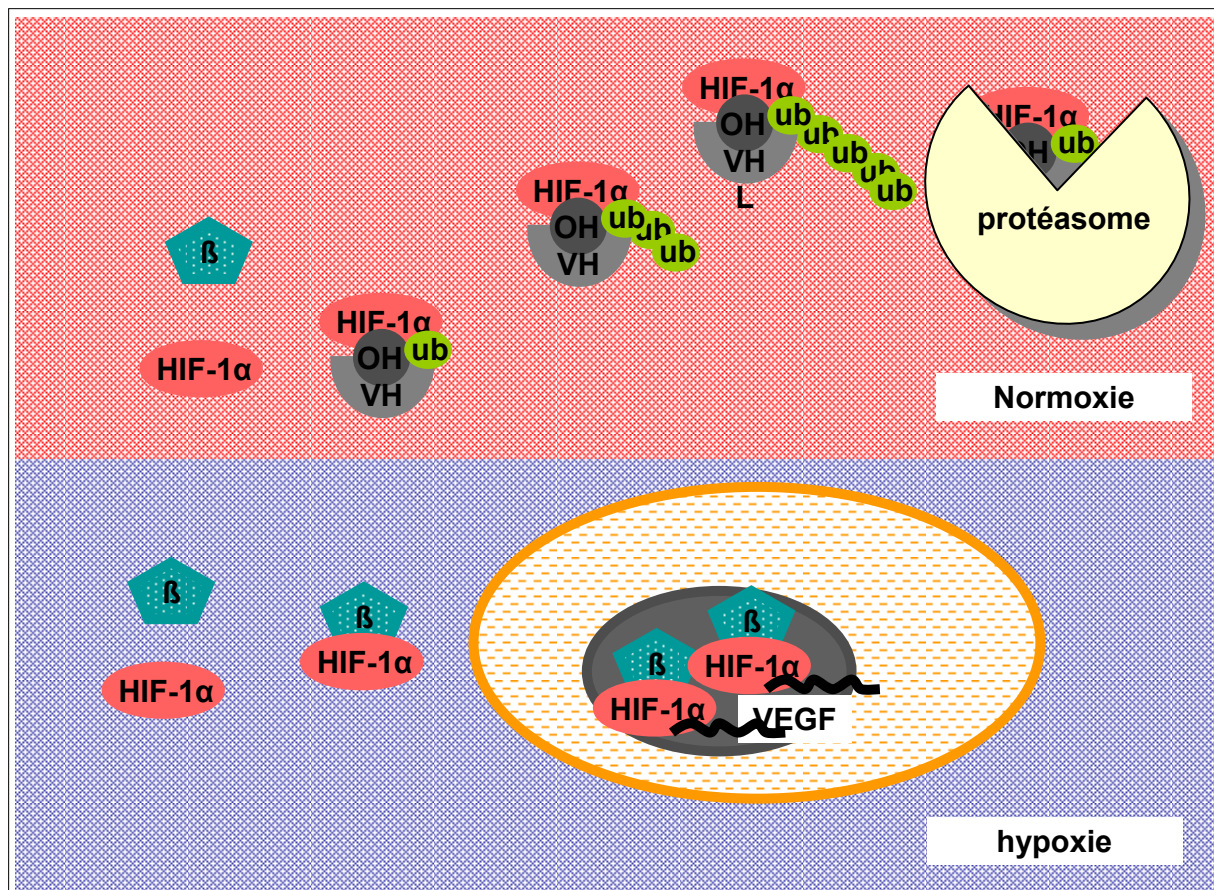


Figure 19 : représentation schématique de l'action du facteur HIF1- α sur la transcription de gènes en réponse à l'hypoxie

En normoxie, les sous-unités α et β du facteur HIF ne se complexent pas ; la sous-unité α s'associe au facteur pVHL, dont l'activité ubiquitine ligase va entraîner la destruction après ubiquitinylation dans la voie du protéasome. En hypoxie, la pVHL ne peut pas se fixer à la sous-unité α , le complexe des deux sous-unités α et β va donc induire la traduction nucléaire de gènes possédant un HRE d'après (Berra, Ginouves et al. 2006).

Dans le tableau suivant sont présentés les principaux facteurs ayant un rôle dans les différentes étapes de la morphogenèse vasculaire et leur lien avec une régulation par HIF-1.

| | Facteurs stimulants | Facteurs inhibiteurs |
|---|--|--|
| Vasodilatation | NOS (Nitric Oxyde Synthase) | |
| Augmentation de la perméabilité vasculaire | VEGF VEGFR-1 VEGFR-2 | Angiopoïétine 1, Tie-2 |
| Extravasation des protéines plasmatiques | VEGF | Angiopoïétine 1, Tie-2 |
| Bourgeonnement endothelial | Angiopoïétine 2, Tie-2 | |
| Dégradation de la matrice extracellulaire | Balance entre la production de MMPs (MMP-2)... Collagène Propyl-4 hydroxylase | ...Et la production de TIMPs (TIMP-1) PAI-1 |

| | | |
|--|---|-------------------------------|
| Libération de facteurs de croissance (dont VEGF, bFGF, IGF) | uPA | Thrombospondine-1 PAI-1 |
| Prolifération et migration des cellules endothéliales | Action coordonnée entre VEGF, angiopoïétines et FGF MCP-1, PDGF | |
| Recrutement des péricytes et cellules musculaires lisses | PDGF | |
| Assemblage endothélial et acquisition d'une lumière | VEGF 121 /165 Angiopoïétine 1, Tie-2 Intégrines | VEGF 189 Thrombospondine-1 |
| Stabilisation des nouveaux vaisseaux | PAI-1 | |
| Maintenance, différenciation des vaisseaux | Angiopoïétine 1, Tie-2 | Angiopoïétine 2, Tie-2 |

Tableau 1 : facteurs régulés, soupçonnés de l'être ou probablement régulés par HIF-1.

Les différents facteurs présentés sont soit directement régulés par HIF-1 via un HRE placé dans leur promoteur (rouge), soit soupçonnés de l'être pour leur comportement en réponse à une inactivation du facteur VHL ou un chélateur du fer (rose), soit probablement lié à une voie liée à HIF-1 (bleu), d'après (Pugh and Ratcliffe 2003).

Mécanismes moléculaires régissant l'acquisition du caractère invasif des cytotrophoblastes.

La pseudovasculogenèse placentaire comprend les étapes qui vont transformer la circulation maternelle pour créer un nouveau réseau vasculaire irrigant un nouvel organe, le placenta. Ceci est majoritairement contrôlé par le phénomène d'invasion des tissus maternels par les cytotrophoblastes. Les mécanismes régissant l'acquisition du caractère invasif sont mal connus chez l'humain, mais il existe quelques certitudes.

- La pression partielle en oxygène régule des gènes impliqués dans cette acquisition, de façon positive. Ainsi, la basse pression en oxygène présente dans la chambre intervillueuse jusqu'à la disparition des bouchons trophoblastiques participe à maintenir le phénotype prolifératif des cytotrophoblastes.
- Les composants de la matrice extra-cellulaire rencontrés par la colonne cytotrophoblastique extravillueuse vont changer progressivement en profondeur : laminine puis fibronectine et collagène. Il s'en suit une modification des intégrines exprimées à la

surface des trophoblastes extravilleux, selon que le trophoblaste soit de type épithélial, interstitiel ou endovasculaire. Il existe un intéressant travail à ce sujet, produit par l'équipe de Susan Fisher (Damsky, Fitzgerald et al. 1992).

La pression partielle en oxygène

Nous avons vu que l'oxygène était une clé de la régulation du caractère prolifératif ou invasif du trophoblaste. Durant les trois premières semaines de développement, la prolifération des cytotrophoblastes est indispensable afin de créer la coque trophoblastique qui entourera le *conceptus*. Passée cette période, il devra préparer la connection de sa circulation avec la circulation maternelle. Pour ce faire, il va progressivement transformer les artères spiralées maternelles, qui, de vaisseaux à haute résistance doivent devenir des vaisseaux à basse résistance. Ceci permettra au flux sanguin artériel maternel d'arriver dans la chambre intervillieuse sans transmettre les à coups de pression. L'invasion trophoblastique interstitielle et endovasculaire vont permettre cette transformation. La mesure de la pression partielle en oxygène dans l'espace intervillieux (uniquement baigné de plasma) entre 8 et 10 SA, montre une valeur de 18 mmHg, pour 40mmHg dans la décidue (Rodesch, Simon et al. 1992). Il existe donc un gradient de pression entre la superficie de la surface endométriale et la profondeur. Ceci va modifier l'expression des gènes régulés par l'hypoxie. Progressivement, avec la croissance placentaire, la coque trophoblastique va devenir moins jointive, puis disparaître, et le sang maternel va envahir la chambre intervillieuse. Le rôle de l'oxygène a été montré *in vitro* par des expériences de culture d'explants placentaires dans différentes conditions d'oxygénation (Genbacev, Zhou et al. 1997). Les explants provenaient d'interruption volontaire de grossesses jeunes (entre 5 et 8 SA), sans pathologies associées. Ils se trouvaient donc en condition d'hypoxie initialement. Ces explants cultivés en présence de 2% d'oxygène développent des excroissances produites par la prolifération des cytotrophoblastes. En présence de 20% d'oxygène, ces excroissances n'existent pas et la prolifération cesse, comme la confirme la diminution de la cycline B2.

L'importance de HIF-1 dans cette étude a été démontré *in vitro* par d'autres expériences sur explants placentaires (Caniggia, Mostachfi et al. 2000). L'équipe de Caniggia a prouvé que l'inhibition de l'acquisition du caractère invasif des cytotrophoblastes par TGF β ₃ passait par la régulation de HIF-1. En effet, l'inhibition de l'expression de HIF-1 α par antisens produit une diminution de la prolifération des trophoblastes et stimule l'acquisition de marqueurs d'invasivité (changement d'intégrine α 5 pour α 1, sécrétion de MMP-9).

Les facteurs de croissance

Les données concernant l'effet des facteurs de croissance sur l'acquisition de ce caractère invasif sont très controversées. Il est probable que les méthodes utilisées pour quantifier ces effets soient en cause, certains utilisant les tests d'invasion/migration en chambre de Boyden avec matrigel®, d'autres des tests sur sphéroïdes de lignées de trophoblastes extravilloux. De plus, la complexité et la hiérarchisation dans le temps et l'espace des régulations régissant cette modification phénotypique ne se prêtent pas facilement aux extrapolations physiologiques à partir d'expériences *in vitro*. Une étude attrayante a été faite en 1995 par l'équipe de J.D Aplin (Aplin 1995), qui a travaillé avec des explants de villosités provenant d'interruption de grossesse entre 8 et 12 SA, mis en culture sur des fragments de décidue recueillis lors du même geste mais provenant de la décidue pariétale, dans un gel de collagène. Cette équipe a montré que les villosités flottantes conservaient leur capacité à se différencier en villosités crampons et à traverser la couche syncytiale par contact avec la décidue, que les cytotrophoblastes de la colonne d'invasion formée acquieraient les mêmes caractéristiques phénotypiques que celles observées *in vivo* (acquisition d'un épitope HLA-G exprimé par les trophoblastes extravilloux à partir du cinquième rang de trophoblastes dans la colonne, intégrine α 1...). Mais aucune autre étude n'a été faite sur ce modèle, qui permettrait de tester dans des conditions proches de la physiologie les effets de différents facteurs et de leur association ou succession.

Les facteurs angiogènes

En 1997, Zhou *et al* ont publié le fait que les trophoblastes, d'origine épithéliale, adoptaient un phénotype endothélial quand ils se différenciaient. Il s'agissait de la première publication qui démontrait une telle modification phénotypique des récepteurs d'adhésion (Zhou, Fisher et al. 1997). En culture et en test de migration/invasion en chambre de Boyden à travers du matrigel®, les cytotrophoblastes perdaient l'expression de la E-cadhérine, acquièrent celle de la VE-cadherine, du PECAM-1, V-CAM-1, de l'hétérodimère d'intégrine $\alpha v\beta 3$. De plus, en 1994 avait déjà été rapporté la présence du récepteur au VEGF de type 2 (VEGF-R2) dans les trophoblastes, cellules de lignage non endothélial (Charnock-Jones, Sharkey et al. 1994).

Il était donc très compréhensible d'étudier l'effet de facteurs agissant sur l'endothélium des vaisseaux sur les trophoblastes et leur différenciation.

VEGF et trophoblastes

Les quatre formes du VEGF A ont été mises en évidence dès 1993 (Sharkey, Charnock-Jones et al. 1993) dans le placenta humain, et ses sites d'expression retrouvés être les macrophages de la décidue maternelle et les macrophages fœtaux de la villosité (cellule de Hofbauer). L'année suivante, pour la première fois, le récepteur de type 2, VEGF-R2 a été retrouvé comme étant présent dans des trophoblastes (Charnock-Jones, Sharkey et al. 1994). Sur des coupes de placentas de grossesses au premier trimestre et à terme, l'ARNm du récepteur a été trouvé en grande quantité dans les trophoblastes extravilloux de la coque trophoblastique, les trophoblastes extravilloux des colonnes –surtout au pied de la colonne- et interstitiels, mais également en plus faible quantité dans les cytotrophoblastes villositaires. En 1998, une première étude fonctionnelle du rôle du VEGF sur les trophoblastes extravilloux a montré que, sur une lignée de TEV non immortalisée (HTR-8) qui présentait les deux récepteurs VEGF-R1 et –R2, le VEGF stimulait modérément la prolifération, sans modifier la migration ou l'invasivité (Athanassiades, Hamilton et al. 1998). Différentes études ont été faites par la suite, mais avec des lignées différentes, dont certaines immortalisées ou issues de choriocarcinomes, et les effets du VEGF sur les différents

types de trophoblastes ne peuvent pas être extrapolés aux effets *in vivo* (Lash, Cartwright et al. 1999),(Qian, Lin et al. 2004),(Fukushima, Miyamoto et al. 2005). En 2004, Demir et son équipe ont montré dans des villosités très précoces (entre 22 et 48 jours de développement), par microscopie électronique à transmission et immunohistochimie, que le VEGF était exprimé d'abord dans les cytotrophoblastes villositaires alors que les récepteurs se trouvaient initialement dans les cellules hémangioblastiques, puis que les cellules de Hofbauer exprimaient à leur tour le VEGF à la phase d'angiogenèse villositaire (Demir, Kayisli et al. 2004). Ceci laisse supposer qu'il existe une complémentarité entre les trophoblastes et les cellules endothéliales, et probablement à la phase très précoce de la vasculogenèse villositaire.

Angiopoïétines/récepteurs et trophoblastes

La première étude sur l'expression des récepteurs Tie-1 et Tie-2 a été faite en 2000, par immunohistochimie, sur des placentas issus de terminaisons de grossesse au premier trimestre. Il a été démontré que les deux récepteurs étaient présents sur les cytotrophoblastes villositaires, sur les syncytiotrophoblastes ainsi que sur les trophoblastes interstitiels (Vuorela, Carpen et al. 2000). La même année, une autre équipe a mis en évidence une expression de Tie-2 et de son ligand angiopoïétine 2 (Ang-2) par hybridation *in situ* et northern blot à certains moments de la gestation. Elle a montré que Ang-2 n'était exprimée qu'au cours du premier trimestre, le récepteur Tie-2 étant présent au cours des trois trimestres, mais majoritairement au cours du premier. Le lieu d'expression majoritaire de Tie-2 était les TEV endovasculaires et les cellules endothéliales fœtales et maternelles. Le lieu d'expression majoritaire de Ang-2 était les syncytiotrophoblastes (figure 20). Ceci laisse entrevoir un rôle de Ang-2 via Tie-2 sur les TEV endovasculaires dans leur remplacement de l'endothélium maternel et la modification des parois des artères spiralées (Goldman-Wohl, Ariel et al. 2000). Enfin, l'équipe de Ahmed, sur des lignées spontanément modifiées (ED27 et ED77) de trophoblastes issus de grossesses au premier trimestre, présentant des propriétés de cytotrophoblastes et de TEV respectivement, a montré que l'Ang-2 stimulait la

synthèse d'ADN des cytotrophoblastes ED27 et leur relargage de monoxyde d'azote, alors que Ang-1 stimulait la migration des TEV ED77 de manière dose dépendante, action bloquée par l'ajout de la fraction Fc du récepteur Tie-2 (Dunk, Shams et al. 2000). Une étude fonctionnelle sur explants villositaires de premier trimestre a montré que le niveau d'expression de Ang-2 était augmenté, par un mécanisme transcriptionnel, en conditions hypoxiques, alors que l'ARNm de Ang-1 était diminué dans les mêmes conditions (Zhang, Smith et al. 2001). Enfin, en 2003, dans des cultures de cellules endothéliales micro-vasculaires utérines, il était montré que le milieu conditionné de trophoblastes protégeait les cellules endothéliales de l'apoptose. De même, le milieu conditionné de trophoblastes stimulait l'angiogenèse de façon comparable au FGF dans des expériences sur membranes chorioallantoïdienne de poussin (Zhou, Bellingard et al. 2003). Toutes ces données suggèrent une forte interaction entre les trophoblastes et plus particulièrement les trophoblastes extravilloux invasifs, et la mise en place de la circulation foeto-maternelle par le biais des angiopoïétines et de leurs récepteurs. Le patron d'expression de ces protéines chez l'humain (similaire à celui retrouvé dans le placenta de babouin, (Babischkin, Suresch et al. 2006)) laisse supposer que dans la première partie de grossesse les trophoblastes favorisent la vasculogenèse et l'angiogenèse avec branchement par l'expression concomitante de VEGF et Ang-1. Dans la deuxième partie de la gestation, les villosités terminales sont occupées par le développement de sinusoides dilatés et spiralés, et la persistance de Ang-2 et Tie-2 pourrait participer à ce développement, favorisant une structure plus lâche des vaisseaux villositaires déjà en place.

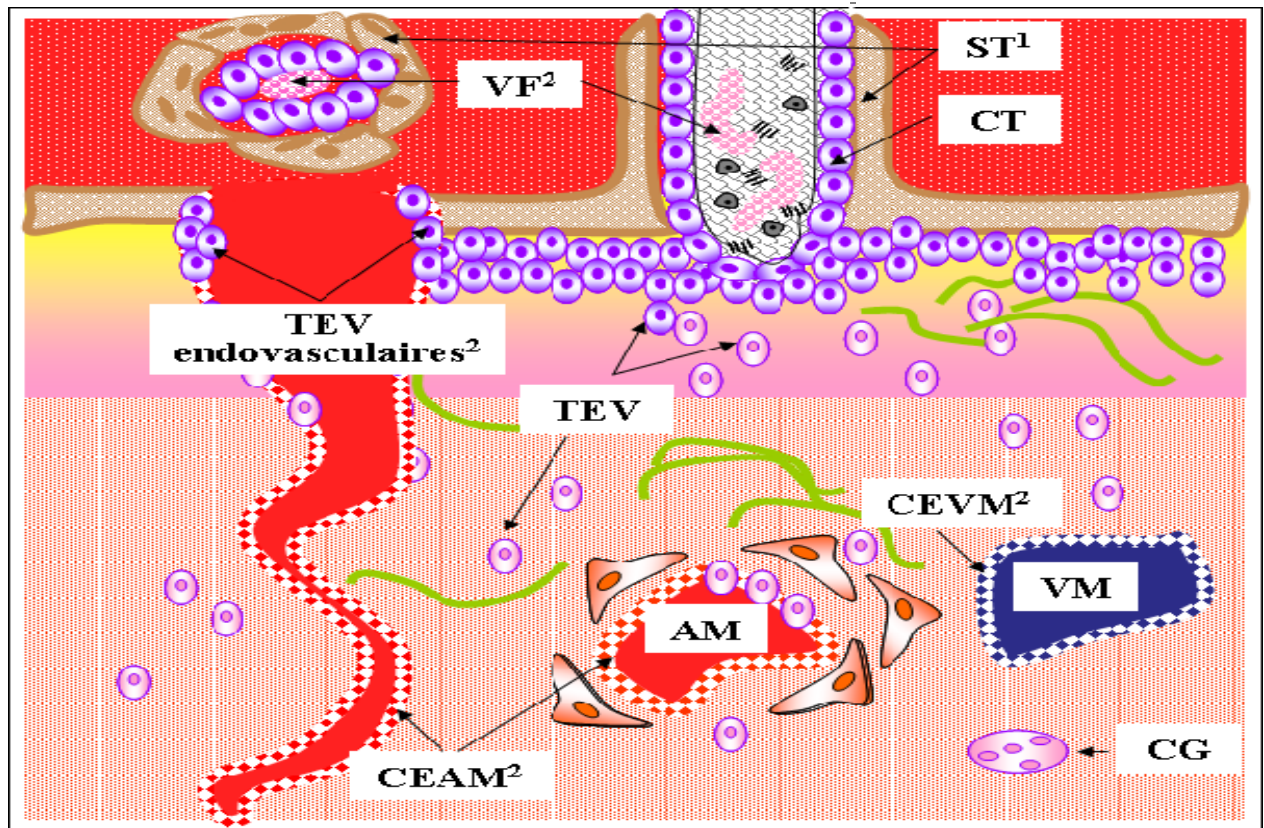


Figure 20 : représentation schématique des localisations de Ang-2 et Tie-2 à l'interface foeto-maternelle.

¹ = Ang-2, ² = Tie-2. ST = syncytiotrophoblastes, CT = cytotrophoblastes, TEV = trophoblastes extravilloux, AM = artère maternelle, VM = veine maternelle, CEAM = cellule endothéliale artérielle maternelle, CEVM = Cellule endothéliale veineuse maternelle. A noter, seuls les TEV endovasculaires acquièrent le récepteur Tie-2., d'après (Goldman-Wohl, Ariel et al. 2000)

Eph/Ephrine et trophoblastes

Les souris invalidées pour le gène de EphB2 ou éphrineB4, protéines jusqu'alors connues pour leur rôle dans le guidage neuronale, ont permis de mettre en évidence un défaut de différenciation du système artério-veineux menant à la mort de l'embryon au 10^{ème} jour post-coïtal, associé à des défauts de trabéculatation cardiaque (Wang, Chen et al. 1998). Leur rôle dans les limites entre artères et veines est largement soupçonné, même si les mécanismes n'en sont pas connus.

En 2005, l'équipe de Fisher a effectué une étude immunohistochimique et fonctionnelle étudiant la répartition des récepteurs Eph et de leurs ligands ainsi que la migration, l'invasion dirigée et la capacité d'agrégation de trophoblastes issus de cultures primaires. Elle a montré que l'acquisition du caractère invasif par les trophoblastes s'accompagnait d'une « *down-regulation* » de leur récepteur EphB4 (marqueur de l'identité veineuse sur les cellules endothéliales) et d'une « *up-*

regulation » du ligand éphrine B1. Dans la décidue maternelle, ces TEV expriment également plus du ligand éphrine B2 (marqueur de l'identité artérielle sur les cellules endothéliales). Au plan fonctionnel, les TEV évitent les substrats couverts par EphB4, et leur migration est inhibée par la co-culture avec des cellules 3T3 qui expriment ce récepteur (Red-Horse, Kapidzic et al. 2005). Cette équipe propose finalement que l'interaction EphB4/éphrineB1 génèrerait des signaux répulsifs pour le TEV, le dirigeant vers la décidue maternelle. Concernant l'envahissement quasi spécifique des artères maternelles et non des veines par les TEV, le couple EphB4 (présent dans l'endothélium veineux maternel)/Ephrine B1 (présente dans le TEV) génèrerait des signaux répulsifs et diminuerait les réponses aux chimiokines, limitant l'interaction avec les veines. Au contraire, la rencontre des TEV avec l'éphrine B2 (présente sur les artères) favoriserait le processus de migration. Ceci est en accord avec l'étude de Chennakesava (Chennakesava, Di Santo et al. 2006) qui a retrouvé au long de la gestation humaine une stabilité des ARN dans le placenta total, mais une variation, avec diminution à terme, des protéines de EphB4 et éphrine B2. La localisation en immunohistochimie montre que EphB4 est régulée dans le temps et dans l'espace (figure 21). Ainsi, à 7SA, ce récepteur est exprimé principalement dans les syncytiotrophoblastes, très fortement dans les cellules géantes de la décidue maternelle, et de façon dispersée dans le mésenchyme. A 12 SA, la structure définitive du placenta est mise en place, EphB4 n'est plus vue que dans la couche apicale du syncytium, dans les vaisseaux fœtaux villositaires, et plus faiblement dans les cellules géantes. A terme, seule une petite bande apicale persiste sur la colonne de TEV et dans les vaisseaux fœtaux. Il n'y a plus de marquage dans les cytotrophoblastes, les syncytiotrophoblastes ou les cellules géantes. Le ligand éphrine B2 quand à lui est largement exprimé par les cytotrophoblastes et les syncytiotrophoblastes, ainsi que les TEV, avec la même intensité à 7 et 12 SA, et une diminution à terme. Dans cette étude, le rôle de l'hypoxie sur ces deux protéines a été étudié sur des lignées de trophoblastes (d'origine

extravilleuse – HIPEC-65 - ou provenant d'un choriocarcinome –BeWo). Il semble que dans les deux lignées, l'hypoxie favorise l'expression de éphrine B2, d'une façon indépendante de HIF-1 α .

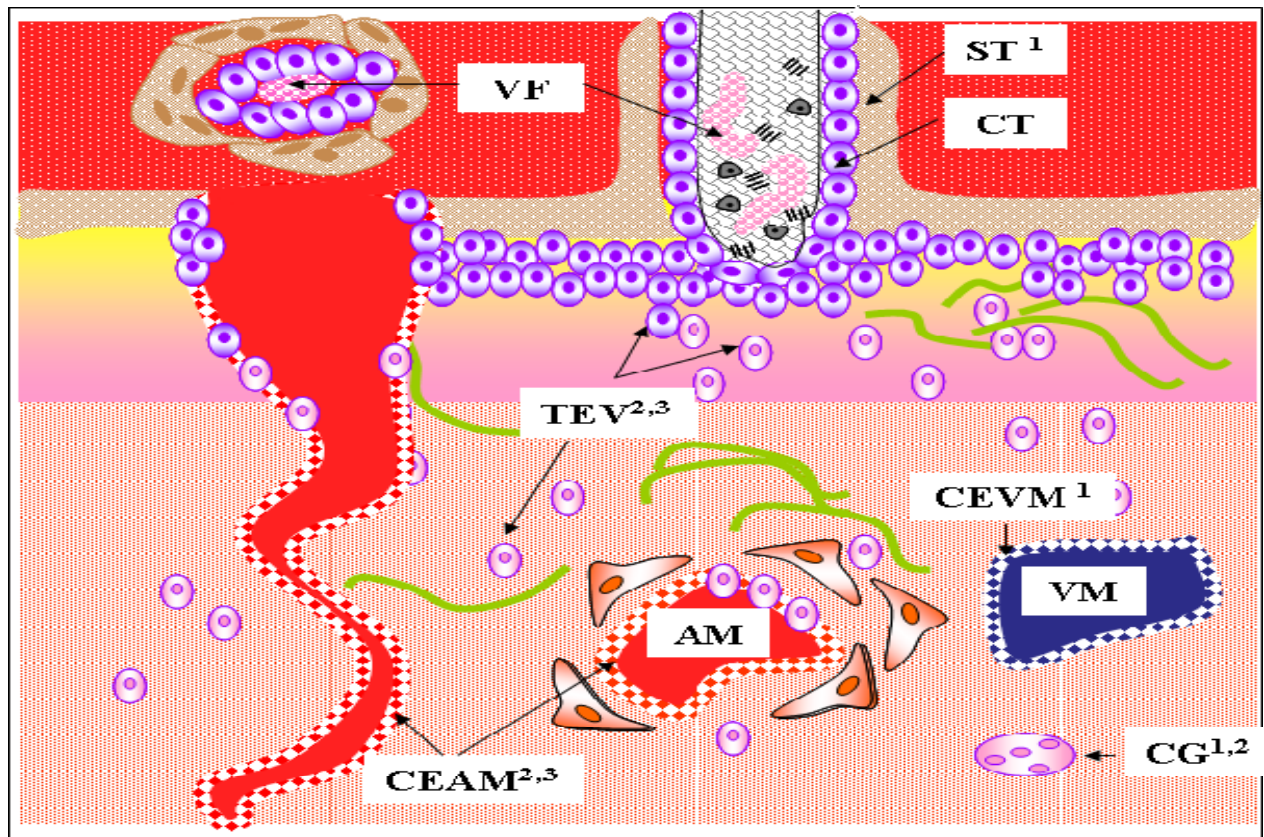


Figure 21 : représentation schématique des localisations de EphB4, éphrine1 et éphrine2 à l'interface foeto-maternelle au premier trimestre.

¹ = EphB4, ² = éphrine B1, ³ = éphrine B2. ST = syncytiotrophoblastes, CT = cytotrophoblastes, TEV = trophoblastes extravilloux, AM = artère maternelle, VF = vaisseaux fœtal, VM = veine maternelle, CEAM = cellule endothéliale artérielle maternelle, CEVM = Cellule endothéliale veineuse maternelle, adapté de (Red-Horse, Rivera et al. 2006)

Il est évident qu'il y a encore beaucoup de chemin à parcourir pour comprendre les différentes régulations qui permettent au trophoblaste de devenir extravilloux puis envahissant. Les facteurs les plus spécifiques de la régulation de la morphogenèse vasculaire – VEGF, angiopoïétines et éphrines et leurs récepteurs - sont impliqués directement dans la mise en place de l'arbre placentaire, mais surtout dans la « pseudo-vasculogenèse » qui a lieu dans les artères spiralées maternelles. Les modèles *in vitro* sont nombreux pour étudier les interactions trophoblastes/décidue ou trophoblastes/cellules endothéliales, expliquant probablement une partie des divergences parfois observées. Il semble que le modèle de culture d'explants placentaires avec

décidue maternelle puisse être un modèle qui permette de s'approcher au mieux de la physiologie, mais les études le mettant en œuvre sont peu nombreuses.

Circulation foeto-maternelle

La circulation foeto-maternelle permettra les échanges foeto-maternels à travers le placenta. Schématiquement, dans chaque tronc villositaire se trouvera un système « artère/capillaires/veine » d'origine fœtale. Tous les troncs seront irrigués par la veine ombilicale et drainés par les artères ombilicales. Dans les villosités terminales, à travers les capillaires, le sang fœtal fera les échanges nécessaires au bien être du *conceptus*. Le placenta sert (entre autres fonctions) à oxygéner le sang fœtal et à le débarrasser de ses déchets.

La circulation foeto-maternelle définitive est schématisée figure 22. Elle comprend d'un côté la circulation maternelle modifiée par la grossesse, et de l'autre côté la circulation fœtale, toutes deux situées de part et d'autre du placenta. En fin de grossesse, le débit y est élevé, de l'ordre de 500ml/min, influencé par la volémie maternelle, les contractions utérines, les hormones, la vasoréactivité des artères utérine.

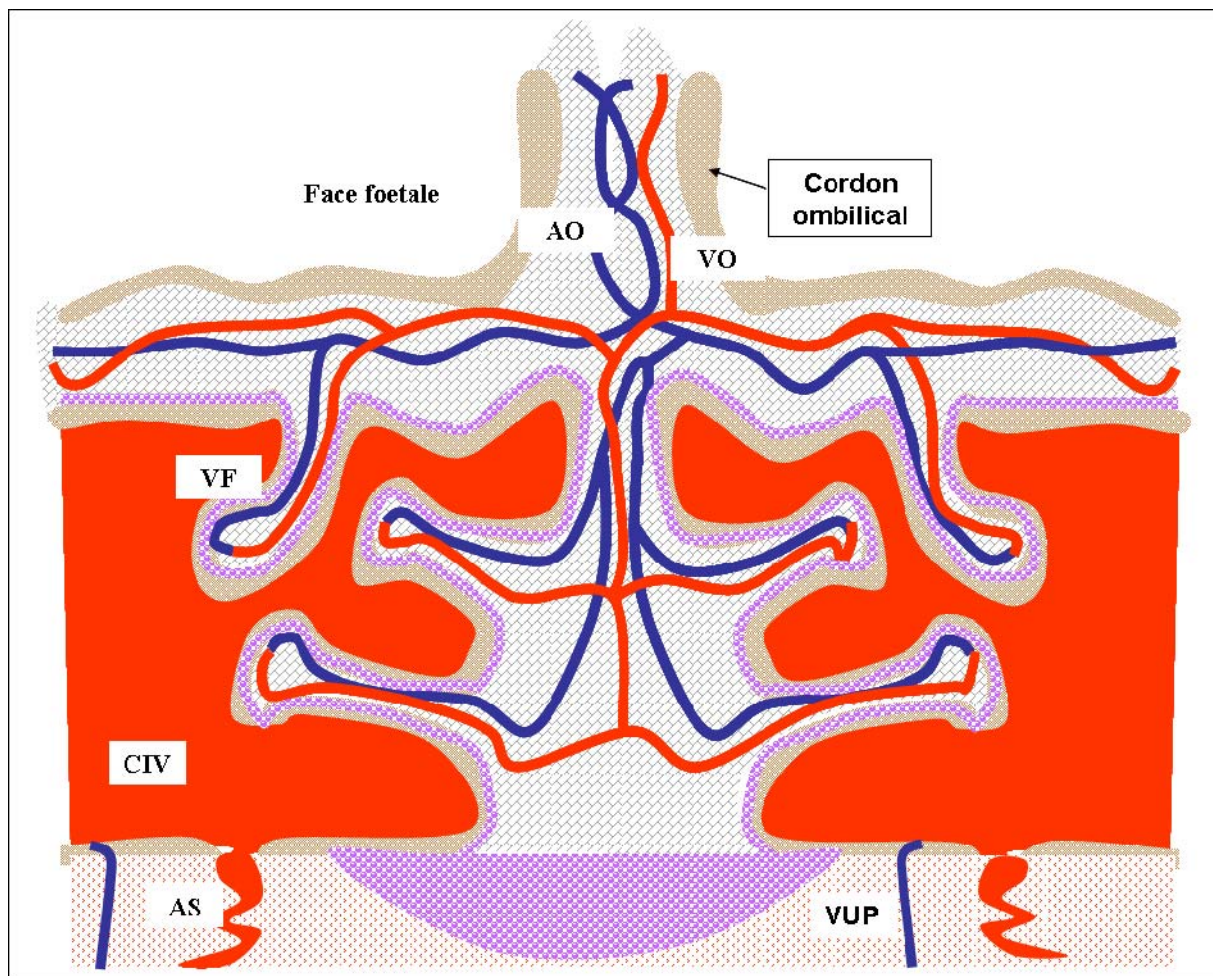


Figure 22 : schéma de la circulation fœtale dans chaque tronc villositaire.

Deux artères ombilicales (AO) assurent l'apport à chaque tronc villositaire du sang fœtal chargé de déchets. Lors de son passage dans la villosité, les échanges avec la chambre intervillieuse (CIV) se font, le sang est oxygéné et ramené vers le fœtus via la veine ombilicale (VO). Les artères spiralées (AS) amènent le sang maternel oxygéné dans la chambre intervillieuse. Le retour vers les poumons maternels se fait via les veines utéroplacentaires (VUP). Les capillaires se trouvant à l'extrémité des villosités terminales n'ont pas été représentés. VF = villosité flottante

Ainsi, le placenta sert de poumon au fœtus, oxygénant le sang désaturé. Le cordon ombilical contient la veine ombilicale, dont les hématies sont chargées d'oxygène, et qui amène le sang épuré au fœtus. Après un circuit de « distribution », le sang désaturé est ramené au placenta par les artères ombilicales. En conditions physiologiques, la pression dans les vaisseaux fœtaux et leurs ramifications villositaires est toujours supérieure à celle qui règne dans la chambre intervillieuse. Ceci évite aux vaisseaux fœtaux d'être collabés. Les échanges materno-fœtaux sont

favorisés dans les villosités terminales, dans des zones appelées « membranes vasculo-syncytiales ». Leur structure est présentée dans la figure 23.

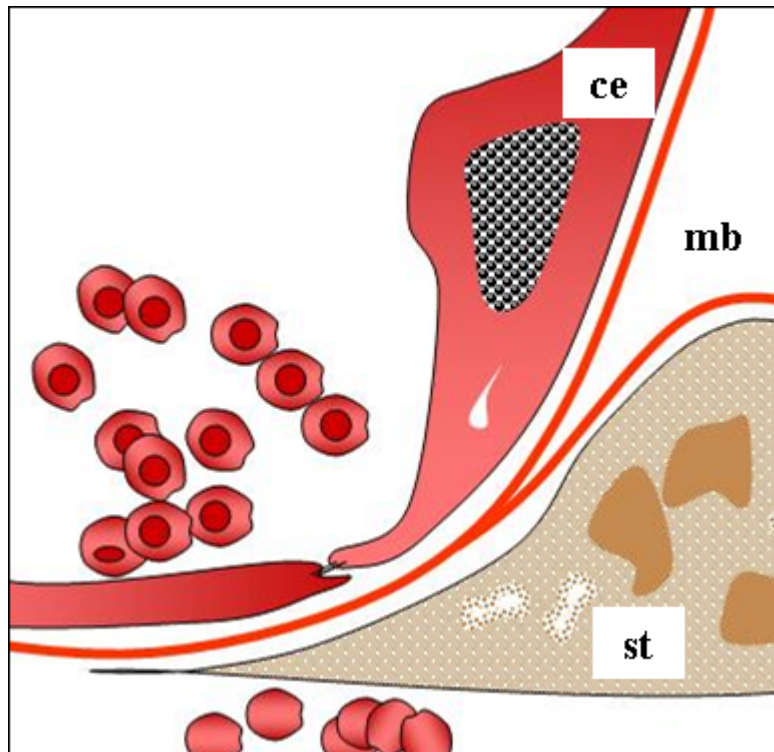


Figure 23 : membrane vasculo-syncytiale.

Les hématies fœtales du capillaire (cellules nucléées) ne sont séparées des hématies maternelles que par le syncytium, les membranes basales fusionnées et l'endothélium. Cette structure est principalement retrouvée dans le bout terminal des villosités définitives, où les capillaires (lieu où vont se faire les échanges) sont dilatés en sinusoides.

Ce = cellule endothéliale,
st = syncytiotrophoblaste,
mb = membrane basale

De parti pris, je ne présenterai pas ici la mise en place de la circulation intra-embryonnaire, mais seulement la mise en place de la circulation fœtale intra placentaire et sa connection aux vaisseaux chorioallantoïdiens. Il est bien établi que, dans les conditions physiologiques, le placenta est toujours en phase d'adaptation, pour répondre aux besoins sans cesse croissants du fœtus. Les processus régissant la mise en place de la circulation foeto-placentaire sont donc des mécanismes dynamiques, se déroulant schématiquement par vagues successives, plusieurs zones de croissance différentes pouvant être vues dans le même temps. La zone centrale du placenta (placée en regard de l'insertion ombilicale dans les conditions optimales, voir mécanismes d'établissement des membranes) est considérée comme la zone à plus fort potentiel de croissance.

La structure placentaire humaine définitive

Schématiquement, chaque tronc primitif villositaire donnera un arbre villositaire qui formera un cotylédon. Les cotylédons seront séparés les uns des autres par des replis de la décidue maternelle, les *septa*. Le placenta formera ainsi un organe discoïde, théoriquement centré par le cordon ombilical, composé de 20 à 30 cotylédons.

La circulation placentaire se divise en deux circulations distinctes :

- la circulation maternelle, composée de l'apport de sang oxygéné dans la chambre intervillieuse par les artères spiralées. Le sang se répand et circule entre les ramifications des arbres villositaires et d'un drainage du sang désaturé et chargé de déchets par les veines utérines.
- la circulation fœtale, dans laquelle les artères ombilicales puis les artérioles amènent dans les villosités le sang chargé de déchets et désaturé. Celui-ci après passage dans un réseau capillaire est ramené épuré et oxygéné au fœtus par la veine ombilicale.

Les deux circulations, bien que parfois proches, par exemple dans les membranes vasculo-syncytiales, sont complètement séparées. On parle ainsi de placentation hémochoriale. Il existe des situations pathologiques dramatiques où la circulation fœtale est en contact direct avec la circulation maternelle. Ceci crée une véritable transfusion foeto-maternelle, avec des conséquences mortelles pour le fœtus, du fait d'une pression toujours supérieure dans la circulation fœtale intravillositaire par rapport à la circulation maternelle.

Quelques notions de rhéologie

On a longtemps pensé que la circulation materno-fœtale était en série, le sang maternel arrivant par les artères utérines, puis radiées, arquées et enfin spiralées (figure 11) se déversant dans la chambre intervillieuse, puis retournant à la circulation maternelle par les veines utérines après un passage autour des villosités. La chambre intervillieuse était sensée se comporter alors comme un shunt artério-veineux. On a longtemps dit que les à coups du débit de perfusion maternelle était transmis directement dans la chambre intervillieuse, et que la transformation des artères spiralées

était le principal « amortisseur » de ces variations. Dans un tel système, lors de l'accouchement, après la délivrance, les artères spiralées du site d'insertion placentaire transformées se trouveraient abouchées à plein canal dans la cavité utérine, et la force nécessaire à la mise en place d'une striction mécanique par la contraction du muscle utérin serait immense. De plus ceci ne laisserait jamais à l'obstétricien assez de temps pour sauver la mère qui présente une inertie utérine en post-partum immédiat. De fait, l'existence d'un autre système que cette circulation en série était soupçonnée depuis longtemps, et en 1956 heckel *et al* avaient déjà décrit des anastomoses artérioveineuses intramyométriales sous la plaque basale placentaire, sans pouvoir l'intégrer à la physiologie connue à cette époque (Heckel and Tobin 1956). En 2005, Shaaps et son équipe ont mis en évidence l'existence de telles anastomoses par combinaisons de techniques d'imagerie doppler 3-dimensions, de moulage de la circulation utérine *in toto* après délivrance et de mesures de la concentration en oxygène dans la veine utérine et la chambre intervillieuse. Ils ont mis en évidence la présence de larges anastomoses artério-veineuses seulement dans la zone myométriale d'implantation, qui disparaissaient progressivement après la naissance (Schaaps, Tsatsaris et al. 2005). Ceci ouvre le champ à des recherches sur les modifications de la circulation maternelle provoquée non seulement dans les artères spiralées, mais également dans les artères et les veines sous-jacentes par l'insertion placentaire. Le rôle des TEV et des facteurs angiogènes dans les modifications structurales des artères spiralées permet de spéculer sur leur implication dans le changement radical observé dans le système artério-veineux en regard de la plaque basale...

Dans tous les lits vasculaires, l'accroissement du flux est obtenu par une combinaison d'ajustements physiologiques, à savoir la modification de la pression de perfusion (« tension » artérielle), la diminution de l'impédance et des changements anatomiques (augmentation de diamètre et diminution de longueur, branchements en parallèle plutôt qu'en série). Selon la loi de Poiseuille, la résistance au flux est directement proportionnelle à la longueur du vaisseau et

inversement proportionnelle au carré de la surface de section du vaisseau. L'anatomie vasculaire influence l'impédance de deux façons : en contrôlant la longueur des vaisseaux (croissance par élongation) et en modifiant leur arrangement spatial (angiogenèse avec ou sans branchement). De plus le débit sanguin est lui-même proportionnel au diamètre du vaisseau à la puissance 4. Ceci donne au placenta une possibilité d'accroissement de son débit de perfusion par les artères spiralées très importante.

Ainsi, la vascularisation fœtale intravillositaire, par modifications d'organisation spatiale ou de longueur va s'adapter aux besoins du fœtus et optimiser l'extraction d'oxygène par la villosité à partir de la chambre intervillieuse. Les deux types d'angiogenèse, avec branchement ou sans branchement, vont respectivement permettre l'une ou l'autre des modifications.

Vasculogenèse placentaire

Au cours du développement embryonnaire, la formation des vaisseaux est arbitrairement divisée en deux parties.

La première est la phase de vasculogenèse, ou formation de vaisseaux *de novo* à partir de précurseurs hémangioblastiques. Les cellules progénitrices sont retrouvées dans le sac vitellin, puis elles migrent dans le mésenchyme extra-embryonnaire et vont coloniser le stroma villositaire.

Il semble exister une cellule souche commune qui donnera les cellules endothéliales et les cellules hématopoïétiques. Durant cette première étape, un réseau capillaire est formé à partir de cellules précurseurs endothéliaux qui s'organisent en tubules (vasculo) (figure 24). Dans la villosité, cette étape est assez précoce, puisque l'on retrouve de telles structures dans les villosités tertiaires dès 5 SA.

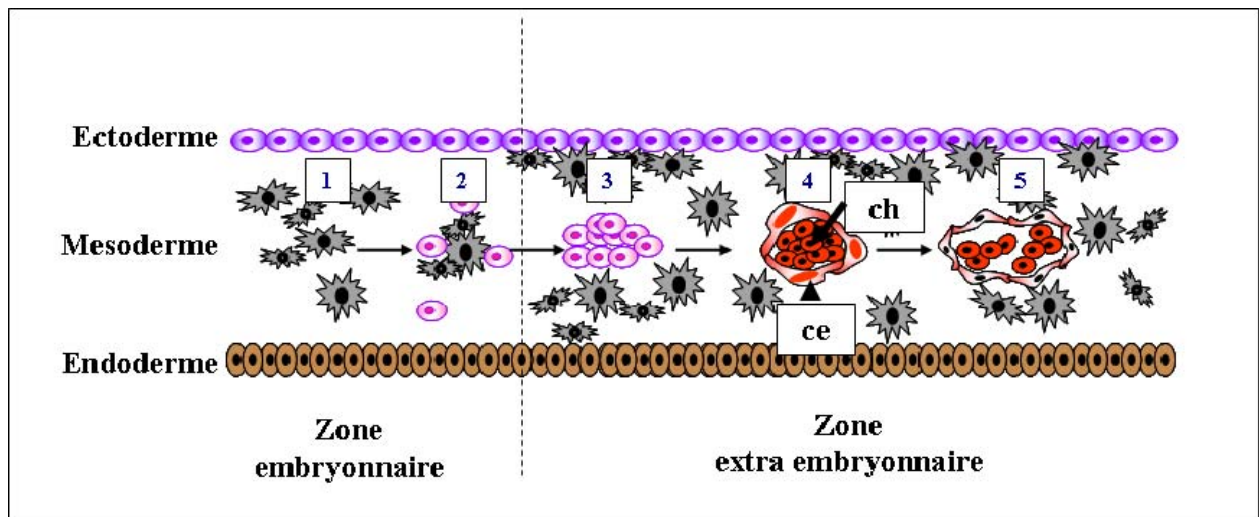


figure 24 : mise en place du système vasculaire foetal dans la villosité.

Après leur différenciation dans le sac vitellin, les îlots sanguins migrent. Ils sont formés de cellules endothéliales en périphérie (ce) et de cellules hématopoïétiques (ch) au centre. Les îlots constituent rapidement un réseau capillaire, qui servira d'échafaudage à la circulation fœtale, mise en place dans mésenchyme extra embryonnaire. 1 : mésoderme indifférentié. 2 : hémangioblastes. 3 : agrégats hémangioblastiques. 4 : îlots sanguins. 5 : capillaire primordial. ce =cellule endothéliale, ch =cellules hématopoïétiques, d'après (Eichmann, Yuan et al. 2005)

La vasculogénèse placentaire se déroule entre le 21^{ème} et le 32^{ème} jour post conception. La vascularisation de la première génération de villosités placentaires est liée à la formation *de novo* à partir de cellules précurseurs plutôt que par protrusion de vaisseaux embryonnaires dans le placenta. Au stade où la vasculogénèse commence, l'arbre villositaire n'est formé que de villosités primaires et secondaires, les dernières étant envahies par une stroma lâche dérivé de la cavité coelomique extra-embryonnaire.

Les premiers précurseurs de l'endothélium fœtal sont visibles très tôt, dès 15 jours de développement. Ces cellules forment des agrégats de cellules polygonales, reliées entre elles par des desmosomes ou des jonctions ressemblant à des jonctions serrées (Kaufmann, Mayhew et al. 2004). A 28 jours post-conception, les agrégats donnent des tubules. Des cellules mésenchymateuses s'apposent à eux. Elles ont un réticulum endoplasmique rugueux très développé et deviendront des péricytes.

Facteurs angiogènes durant la vasculogénèse

Le facteur basique de croissance des fibroblastes (FGF-2 ou bFGF) n'a jamais été trouvé comme étant présent si tôt dans la gestation. Son rôle *in vivo* ne peut donc être qu'hypothétique. En revanche, le VEGF-A est responsable de l'engagement, de la croissance et de l'agrégation des précurseurs endothéliaux pour former les cordons hémangioblastiques, et il est très exprimé dès le début de la gestation. Il est localisé dans les cytotrophoblastes villositaires et les macrophages du stroma. Ces macrophages se différencient dans le stroma dès avant le développement des cordons hémangioblastiques (Ferriani, Ahmed et al. 1994). Le VEGFR-2 est très tôt localisé dans l'endothélium des vaisseaux fœtaux placentaires et les expériences d'inactivation de ce gène chez la souris ont montré qu'il avait un rôle précoce dans le recrutement et la différenciation des précurseurs hémangioblastiques (Shalaby, Rossant et al. 1995).

L'apparition d'un segment de capillaire non connecté dans la villosité permet de définir la villosité tertiaire, qui représente un stade plus avancé de la mise en place placentaire. Le VEGFR-1 a été trouvé dans les macrophages fœtaux, les trophoblastes villositaires et les cellules endothéliales fœtales villositaires. Le VEGFR-1 a été montré comme régulant l'action du VEGF-A sur les précurseurs endothéliaux. Cependant, la délétion de la portion codant pour la tyrosine kinase de ce gène n'a pas d'effet sur la structure vasculaire placentaire ou fœtale (Hiratsuka, Minowa et al. 1998). Ceci n'exclut pas que la partie extracellulaire du récepteur *per se* puisse être responsable du développement vasculaire placentaire. Il est donc possible que les effets passent par le récepteur soluble au VEGF, sFlt-1. Et il est montré que les trophoblastes sont une grande source de sFlt-1 (Clark, Smith et al. 1998; Nagamatsu, Fujii et al. 2004) ...

Angiogenèse placentaire

La deuxième étape va permettre d'obtenir des vaisseaux définitifs, adaptés à leur environnement et à leur fonction, formant un système circulatoire complet avec artères/capillaires/veines. En effet, le réseau vasculaire mature se caractérise par une organisation hiérarchique de vaisseaux larges et étroits.

Cette étape, appelée angiogenèse, processus morphogénétique par lequel les plexus vasculaires initiaux de taille homogène vont subir un remodelage important, aboutit à une maturation et stabilisation des vaisseaux. (figure 27).

Durant le développement embryonnaire, l'étape d'angiogenèse est cruciale pour l'établissement de la circulation materno-fœtale et la survie embryonnaire. En effet, la circulation primitive va du cœur- dont les premiers battements interviennent à la 5^{ème} SA- aux artères choroïdo-allantoidiennes via l'aorte primitive dorsale, passe dans la circulation de l'arbre villositaire et retourne au cœur par le sinus antérieur veineux via les sinus veineux périphériques. A ce stade, le plexus villositaire n'est pas organisé et se compose de nombreux tubules plus ou moins bien connectés. Ce type de circulation ne peut persister car elle serait responsable de shunt artério-veineux responsables de la mort de l'embryon par « vol vasculaire ». La solution à ce gênant problème de tuyauterie a été pour l'embryon de ne pas inclure tous les tubes du plexus vasculaire primitif lors de la formation de l'artère vitelline, certains étant déconnectés du réseau. Cette déconnection des branches latérales est régulée par le flux sanguin. Ceci a été bien démontré dans la vésicule vitelline de l'embryon de poulet (le Noble, Moyon et al. 2004). Le flux croissant dans le vaisseau central, augmentant le diamètre, diminue la circulation dans les branches latérales dont la lumière finit par s'occlure. Ces vaisseaux déconnectés sont ensuite réutilisés pour façonner le réseau veineux embryonnaire secondaire. Leur « branchement » est obtenu par bourgeonnement dorsal et parallèle aux artères. Les mécanismes moléculaires dirigeant ce bourgeonnement sont mal connus.

Dans la circulation adulte, le circuit est ainsi plus complexe, le flux sanguin passant des artères aux artérioles de plus petit calibre, puis dans un lit capillaire et enfin dans des veinules puis veines. Le lit capillaire permet une surface d'échange plus grande et un amortissement de la pression sanguine (figure 25).

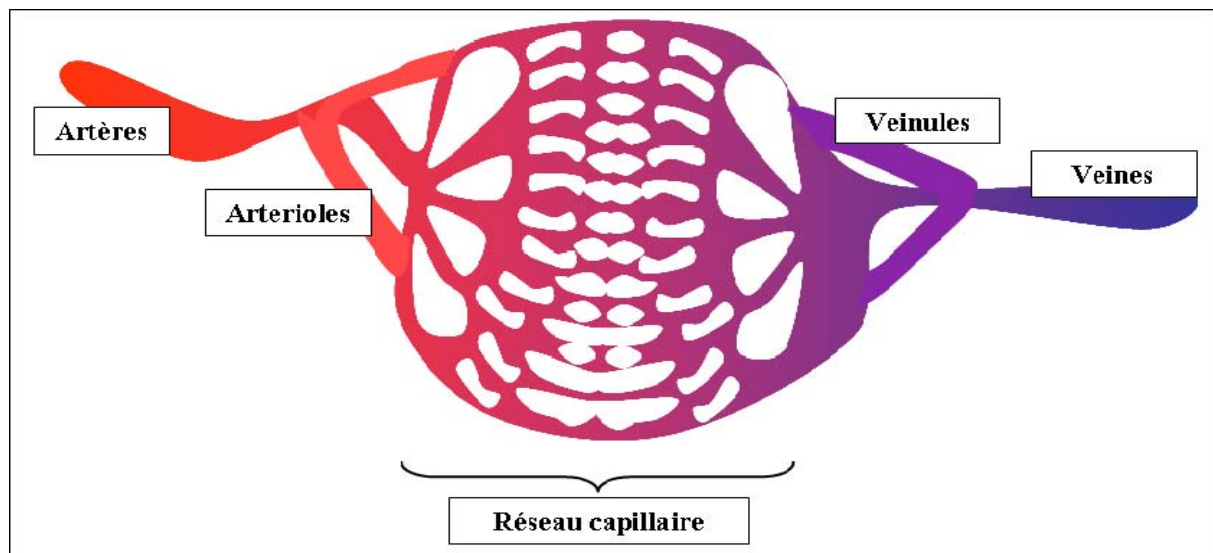


figure 25 : schéma de la circulation de type adulte.

Le sang oxygéné vient du cœur, passe par le réseau capillaire pour distribuer l'oxygène et les métabolites. Désaturé il revient au cœur par les veines. Il sera de nouveau oxygéné par le poumon (le sang y parvient désaturé par les artères pulmonaires et retourne au cœur pour être « redistribué » aux organes par les veines pulmonaires).

Ceci se passe aussi dans l'arbre villositaire placentaire, où dès le stade de villosité tertiaire (21^{ème} jour de développement) un réseau de tubules endothéliaux primitifs est retrouvé. Progressivement, ce réseau est remodelé pour obtenir dans le placenta à terme un riche réseau capillaire dilaté en sinusoides dans les extrémités des villosités terminales (formant les membranes vasculo-syncytiales). Le réseau est extrêmement riche et pénètre les moindres divisions villositaires. Pour arriver à cette organisation, plusieurs étapes sont nécessaires, dont certaines se « croisent » parfois dans le temps, rendant encore plus difficile la compréhension des mécanismes moléculaires

Formation du réseau capillaire 32 jpc à 22 SA : angiogenèse avec branchement

Du 32^{ème} jour post-coïtal jusqu'à la fin du premier trimestre, les segments de tubes endothéliaux se transforment en réseau capillaire primitif par deux mécanismes, élongation correspondant à une angiogenèse sans branchement, et ramification par bourgeonnements latéraux. Dans le stroma des villosités mésenchymateuses, l'angiogenèse sans branchement est la plus abondante et le réseau capillaire est pauvrement développé. Avec l'avancée de la gestation, l'angiogenèse avec

branchement devient prépondérante et ceci est particulièrement visible dans les villosités intermédiaires immatures qui se développent à partir de la 9^{ème} SA.

Seules quelques données sont connues concernant les mécanismes moléculaires qui régissent cette angiogenèse villositaire primitive avec branchement. Des expériences sur membrane chorioallantoïdienne de poulet ont montré que la liaison du VEGF à ses deux récepteurs stimulait l'angiogenèse avec branchement et permettait le développement d'un réseau vasculaire richement connecté (Wilting, Birkenhager et al. 1996). Il est intéressant de noter que l'expression du VEGF-A et VEGFR-2 est plus intense dans les premières semaines de la grossesse et diminue graduellement ensuite. (Vuckovic, Ponting et al. 1996),(Jackson, Carney et al. 1994),(Kumazaki, Nakayama et al. 2002).Au contraire, l'expression du PlGF et de la forme soluble du VEGFR-1 est retrouvée augmentant jusqu'au terme, quand l'angiogenèse sans branchement est prépondérante (Clark, Smith et al. 1998).

Formation des vaisseaux souches de 15 SA à 32 SA

A partir du troisième mois de gestation, certains conduits endothéliaux situés au centre de villosités intermédiaires immatures augmentent de diamètre (100µm et plus). En quelques semaines, ils acquièrent des structures proches d'une média et d'une adventice par fibrose concentrique du stroma environnant et par différenciation de précurseurs de muscle lisse. Ce sont les précurseurs des artères et des veines villositaires. Dans certaines villosités intermédiaires immatures proximales plutôt centrales, une fibrose se développe autour de ces vaisseaux et ainsi naissent les villosités souches, dans lesquelles se trouvent les vaisseaux souches.

La mise en place et le maintien de la partie externe de la paroi des vaisseaux est probablement en partie sous le contrôle des angiopoïétines et de leur récepteur Tie-2. Plusieurs faits corroborent ceci : les ARNm de Ang-1 et Ang-2 ont été détectés dans les cellules périvasculaires des villosités intermédiaires immatures (Geva, Ginzinger et al. 2002). De plus, l'expression de Tie-2 a été détectée par PCR dans des cellules endothéliales villositaires humaines

(Zhang, Smith et al. 2001). Mais la situation est sûrement plus complexe puisque des souris déficientes pour Tie-2 présentent un réseau vasculaire peu développé et que l'activation constitutionnelle de ce récepteur provoque des malformations veineuses (Sato, Tozawa et al. 1995),(Vikkula, Boon et al. 1996).

Régression du réseau capillaire périphérique de 15 à 32 SA

Dans la seconde moitié de la grossesse, après 20SA, le processus de fibrose initié dans le stroma des villosités souches va progresser de façon radiale. Les capillaires superficiels sous trophoblastiques se raréfient. A terme, très peu de capillaires para-vasculaires restent présents dans les villosités souches. Les mécanismes moléculaires régissant cette régression ne sont pas décrits à ce jour, mais force est de constater que cette régression est concomitante de la disparition des trophoblastes dans la partie proximale de la villosité souche et de la raréfaction du nombre de macrophages présents dans la fibrose (Vikkula, Boon et al. 1996), tous deux sources de VEGF-A. Dans le même temps que régressent les capillaires et se fibrosent les villosités souches, dans la zone centrale placentaire, les régions périphériques des arbres villositaires vont voir de nouveaux bourgeons villositaires apparaître, avec un nouveau réseau capillaire mêlant de nouveau les deux types d'angiogenèse. Dans ces nouvelles villosités vont pouvoir de nouveau s'enchaîner les étapes menant à la formation de nouvelles villosités souches. Ainsi, le placenta et le lit vasculaire continuent leur extension.

Prévalence de l'angiogenèse sans branchement de 25 SA à terme

De la 22^{ème} SA au terme, le type de développement vasculaire villositaire va progressivement passer du mode de l'angiogenèse avec branchement, à l'angiogenèse par élongation. Ceci est lié au développement des villosités intermédiaires matures. Celles-ci se développent à l'extrémité des arbres villositaires, sont longues (>1000µm) et assez larges (80-120 µm), et sont pourvues d'un ou deux longs capillaires peu branchés. A ce stade, les marqueurs de prolifération trophoblastique sont très peu exprimés, alors que les marqueurs de prolifération endothéliale augmentent. Ainsi,

les capillaires croissent plus que la villosité, ils « s'entortillent » sur eux-mêmes. Les boucles capillaires ainsi formées vont protuber sous la surface capillaire et contribuer à la formation des villosités terminales (figure 9)

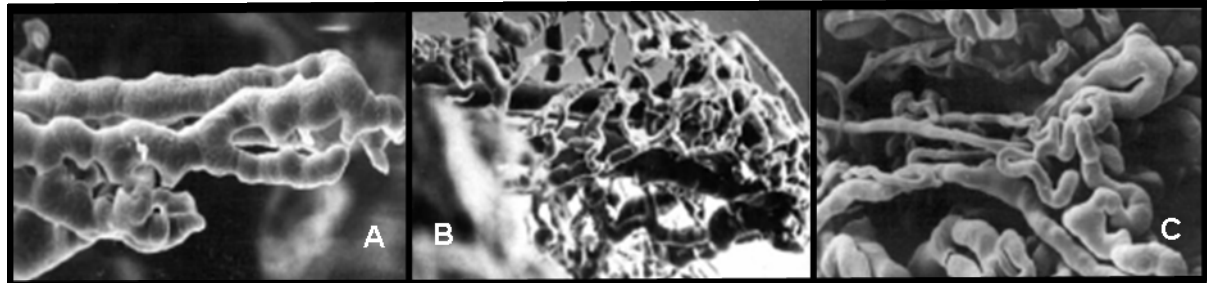


Figure 26 : comparaison de moulages de la vascularisation intra-villositaire à différents âges gestationnels.

A = à 6 SA, modeste angiogénèse avec branchement, x 330 ; B = à 18 SA, angiogénèse avec branchement très développée, x 400 ; C = à terme, angiogénèse sans branchement, avec élancement et replis, x 700. D'après (Kaufmann, Mayhew et al. 2004).

Récapitulatif des étapes de l'angiogenèse physiologique

De la vasculogénèse, qui établit un réseau de tubules non organisés (au hasard ?), à la circulation de type adulte passant par une organisation hiérarchique des vaisseaux, de nombreux événements vont modeler les structures vasculaires. La figure suivante récapitule les connaissances actuelles sur l'angiogenèse physiologique.

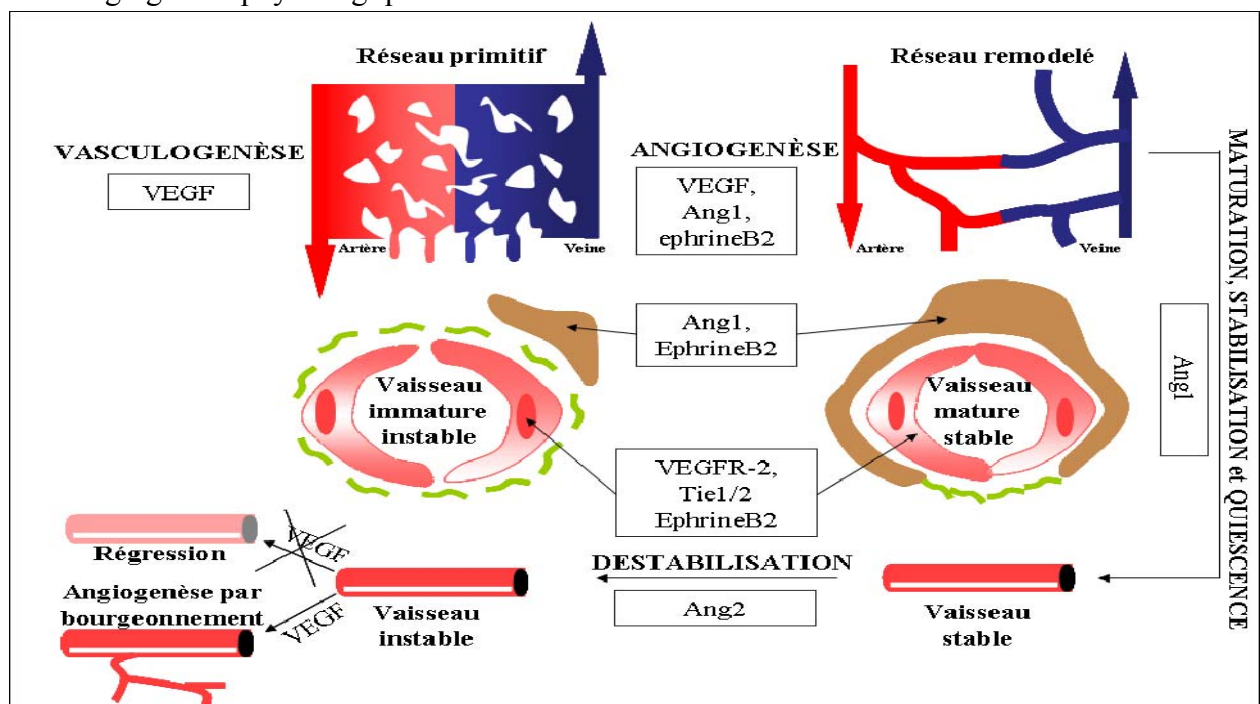


Figure 27 : Les rôles des principaux systèmes régulateurs des cellules endothéliales.

VEGF, angiopoïétines et ephrines sont présentés. A noter, ephrine-B2 marque les vaisseaux artériels exclusivement, dès leur premier stade de développement. D'après (Yancopoulos, Davis et al. 2000)

DEUX CONSEQUENCES D'UN DEVELOPPEMENT PLACENTAIRE HUMAIN PATHOLOGIQUE : LE RETARD DE CROISSANCE INTRA-UTERIN ET LA TOXEMIE GRAVIDIQUE

Le retard de croissance intra-utérin (RCIU)

Le retard de croissance intra-utérin est déterminé par une restriction de croissance d'un fœtus par rapport à un potentiel de croissance génétique. Il est défini par des critères échographiques, avec des biométries fœtales placées en dessous du 10^{ème} percentile (parfois 3^{ème} percentile pour d'autres auteurs = RCIU sévère). Cette restriction peut-être provoquée par certaines conditions environnementales (malnutrition, intoxication, infection...), mais elle peut être liée à une diminution de la taille du placenta. Il convient de bien faire la différence entre le RCIU associé à une autre pathologie (comme la toxémie gravidique) et les fœtus petits constitutionnels. Il existe des tables pour placer le fœtus étudié sur son percentile en fonction des mesures observées, de la taille de ses parents, de la parité de sa mère, de son poids et de son origine ethnique. Le RCIU sera confirmé à posteriori par la constatation après la naissance d'un poids inférieur à celui attendu pour l'âge gestationnel. Nous avons vu que la taille du placenta était en partie liée à la constitution de la coque trophoblastique durant les premières semaines de grossesse. En effet, la prolifération des cytotrophoblastes du pied des villosités crampons et leur « débordement » en deçà de la couche syncytiotrophoblastique permet de mettre le conceptus à l'abri de l'oxygène maternel, protégé par la coque trophoblastique et les bouchons trophoblastiques intra-artériels. On sait maintenant qu'une exposition prématurée des cytotrophoblastes à une pression d'oxygène trop importante va provoquer l'apoptose de ceux-ci, probablement par incapacité de réponse au stress oxydatif. Ainsi, si cette première phase de prolifération et d'invasion des cytotrophoblastes se déroule mal, le sang maternel touchera certaines villosités centrales qui auraient dû participer à la constitution du placenta et dégèneront, le développement ultérieur de l'arbre villositaire s'en trouvera altéré et la taille du placenta sera diminuée. Par contre, le développement des villosités qui ont persisté gardera une progression normale (Mayhew 2003), et pour nombre de ces grossesses le seul signe clinique sera le RCIU. Ce type de RCIU, purement placentaire, est cependant très peu fréquent, et un bilan exhaustif est nécessaire pour éliminer les autres causes.

Ceci est à rapprocher de la constatation d'une circulation précoce dans la chambre intervillieuse observée lors des grossesses qui n'évolueront pas et se termineront par des fausses-couches. Cette circulation n'est pas observée pour les grossesses dont l'issue sera normale. Mais cette différence n'est plus constatée pour les grossesses au-delà de 12 SA, date à laquelle les trophoblastes sont capables de se protéger du stress oxydatif (Jauniaux, Greenwold et al. 2003).

La toxémie gravidique

Appelée souvent pathologie des hypothèses, ce cadre nosologique correspond à une association de signes cliniques maternels associant de façon plus ou moins complète une hypertension artérielle (HTA) apparue après le milieu du deuxième trimestre, des oedèmes et une protéinurie.

La toxémie gravidique, nommée pré-éclampsie par les anglo-saxons, va progressivement s'aggraver et mettre en jeu le pronostic maternel et fœtal. C'est une pathologie fréquente, qui touche environ 5% des grossesses, à des stades de gravité divers. Elle reste la première cause de prématurité induite, et est responsable de près de la moitié de la prématurité entre 28 et 32 SA. A ce titre, elle représente une cause de santé publique importante, tant pour les séquelles immédiates dont souffriront les enfants (dysplasies bronchopulmonaires, leucomalacies,...) que pour les séquelles tardives auxquelles ils seront soumis, à savoir les syndromes métaboliques adultes liés à une programmation fœtale (Luo, Fraser et al. 2006). Les risques fœtaux liés à la toxémie sont le décollement prématuré d'un placenta normalement inséré, l'hypoxie chronique et le RCIU. Les risques maternels sont l'hypertension menaçante, la crise d'éclampsie (convulsions) et une atteinte multi viscérale (rein, foie et endothélium vasculaire).

Ainsi, à un terme où la viabilité fœtale est acquise (après 26 SA), on peut être amené à décider une naissance prématurée pour sauvetage fœtal ou maternel. Plus tôt, une interruption de grossesse pour motif thérapeutique pourra parfois être nécessaire. En effet, seul un traitement symptomatique de l'hypertension et des troubles métaboliques pourra être proposé à la mère, qui

ne ralentira pas l'évolution de la maladie. Dans un cas particulier de toxémie gravidique, le « HELLP syndrome » (Hémolysis, high Enzymes Liver, Low Platlets), un traitement maternel par de fortes doses de corticoïdes va permettre d'améliorer les désordres biologiques et de gagner parfois quelques jours (Martin, Rose et al. 2006). Le fœtus pourra bénéficier d'une cure de corticoïdes (via sa mère) à visée de maturation pulmonaire.

Le rôle de l'ischémie placentaire dans l'établissement de la toxémie gravidique

Argumentaire en faveur de la responsabilité de l'hypoxie

La toxémie gravidique est une maladie humaine, qui n'existe pas en dehors de la présence du placenta. Elle peut par contre survenir en absence de fœtus (môle hydatiforme), et parfois en cas de grossesse ectopique. Elle disparaît rapidement après l'ablation du placenta. Plusieurs lignes d'arguments plaident en faveur d'une origine liée à l'hypoxie placentaire.

- D'abord, depuis longtemps, des lésions à type d'infarctus placentaire et de lésions d'athérosclérose du lit placentaire ont été retrouvées sur des placentas
- issus de grossesses toxémiques (De Wolf, Robertson et al. 1975; Soma, Yoshida et al. 1982).
- Ensuite, les biopsies du lit placentaire ont mis en évidence une invasion insuffisante des artères spiralées, qui se trouvent ainsi grêles et non distensibles (Gerretsen, Huisjes et al. 1981).
- Les facteurs de risques maternels comprennent toutes les situations qui prédisposent à une dysfonction vasculaire maternelle telles que le diabète, le lupus, l'hypertension, les dyslipidémies et les thrombophilies (Dekker and Sibai 1998).
- L'accroissement de la masse placentaire, comme dans les grossesses multiples ou les cas de môle hydatiforme, provoque une diminution du flux vasculaire disponible par unité de volume, et est un facteur de risque de toxémie gravidique (Dekker and Sibai 1998).

- Enfin, l'ischémie provoquée par rétrécissement du diamètre des artères utérines dans des modèles animaux provoque un tableau clinique proche de la toxémie gravidique (Podjarny, Losonczy et al. 2004).

Mécanisme principal conduisant à l'hypoxie

Durant le développement placentaire normal, nous avons vu que les artères spiralées maternelles sont envahies par les cytotrophoblastes extravilloux, les TEV endovasculaires. De même, l'envahissement de la décidue maternelle par les TEV interstitiels est essentiel à la préparation de la modification artérielle. Le remodelage des artères spiralées les transforme de vaisseaux à haute résistance et grande réactivité aux substances vaso-actives en vaisseaux de faible résistance et de haute capacitance (figure 28).

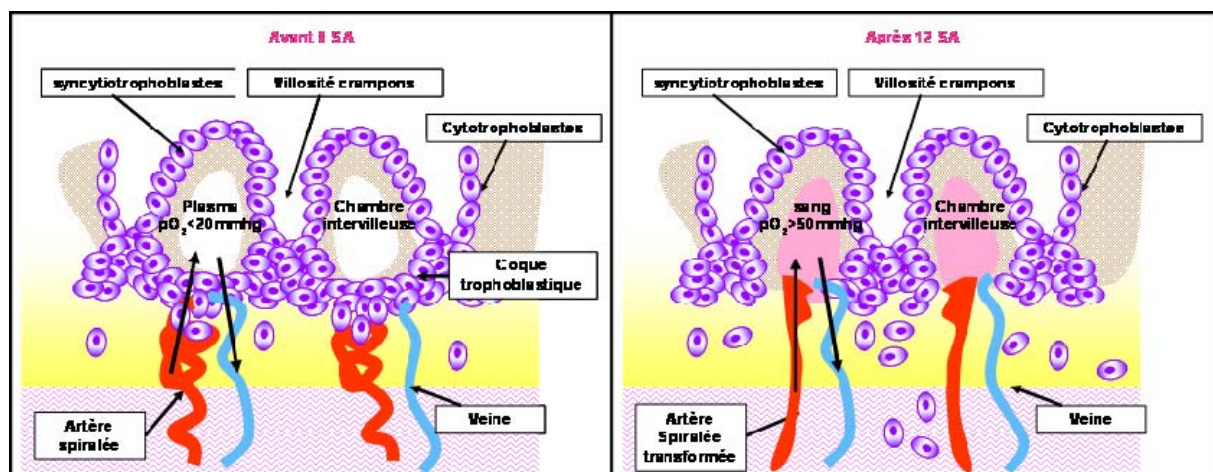


Figure 28 : schéma représentant l'irrigation de la chambre intervillueuse avant la disparition des bouchons trophoblastiques (8 SA) et après leur disparition, après 12 SA.

La disparition des bouchons trophoblastiques est progressive durant la période intermédiaire. A noter, les artères spiralées sont transformées à 12 SA, plus larges, moins réactives. Adapté d'après (Challier and Uzan 2003).

Si l'on se place d'un point de vue finaliste, il est plus rassurant que les à-coups du flux sanguin arrivant dans la chambre intervillueuse puisse être atténués par la faible résistance des artères spiralées, et que les modifications artérielles maternelles générales puissent lui être épargnées par la perte de réactivité des dites artères. Comme nous l'avons vu dans le chapitre sur le développement physiologique placentaire, nous seulement l'endothélium des artères spiralées est un temps remplacé par des TEV endovasculaires, mais la média élastique est remplacée par une

substance fibrinoïde. Les mécanismes primaires menant à une transformation insuffisante des artères spiralées sont mal connus à ce jour. Il existe des facteurs génétiques, immunologiques et environnementaux qui participent à des défauts d'invasion et de prolifération des trophoblastes. Mais le *primum movens* de l'acquisition du caractère invasif des trophoblastes semble être la différence de tension en oxygène comme le suggèrent les travaux de S.Fisher. En 1996, elle et son équipe ont montré que l'hypoxie altérait la capacité des cytotrophoblastes *in vitro* à envahir le matrigel® ou de la décidue maternelle et modifiait également le changement d'intégrines qui caractérise l'acquisition du caractère invasif. Par contre, la culture en condition hypoxique conduisait à une augmentation de la prolifération des cytotrophoblastes (Genbacev, Joslin et al. 1996). L'année suivante, la même équipe a montré par des expériences avec explants placentaires précoces cultivés sur matrigel®, que l'hypoxie permettait aux cytotrophoblastes des villosités crampons de continuer à proliférer avec une faible différenciation et que la culture en conditions normoxiques permettait d'obtenir une différenciation en cytotrophoblastes invasifs (Genbacev, Zhou et al. 1997). Il ne faisait alors plus de doute que l'oxygène était un facteur clé de l'acquisition du caractère invasif des cytotrophoblastes, et que la persistance de conditions hypoxiques allait participer aux défauts d'invasion observés dans la toxémie gravidique.

Dans le travail de Burton *et al* sur la collection de Boyd, reprenant 12 spécimens d'hystérectomies avec grossesse évolutive entre 43 et 130 jours, il a été clairement montré que les connections artérielles maternelles vers la chambre intervillieuse n'existaient pas avant 8 SA, s'observait progressivement ensuite, pour être tout à fait fonctionnelles à partir de la 12^{ème} SA (Burton, Jauniaux et al. 1999). Ceci est également en accord avec les travaux en échographie doppler réalisés par Schaaps, qui trouve une apparition progressive du flux sanguin dans la chambre intervillieuse entre la 8^{ème} et 12^{ème} SA (Foidart, Hustin et al. 1992). Il semble donc évident qu'un défaut primitif de transformation des artères spiralées va potentialiser le phénomène d'hypoxie placentaire en maintenant les cytotrophoblastes dans un phénotype

prolifératif plutôt qu'invasif. L'augmentation de la tension en oxygène dans la chambre intervillieuse intervient progressivement entre la 8^{ème} et la 12^{ème} semaine d'aménorrhée dans les grossesses physiologiques. En effet, la croissance du placenta, qui s'étend latéralement, semble par un effet mécanique provoquer une disjonction entre les trophoblastes des bouchons trophoblastiques. Cet effet serait ainsi maximal au centre du placenta, et ceci est en accord avec les études de Burton *et al* qui ont montré que l'invasion des artères spiralées maternelles était maximale dans les régions centrales du placenta (Jauniaux, Hempstock et al. 2003). Les premières mesures de la pression partielle en oxygène faite en 1992 (Rodesch, Simon et al. 1992), puis celles effectuées en 2000 et 2001 (Jauniaux, Watson et al. 1999), (Jauniaux, Watson et al. 2000), ont montré que la PO₂ passait de <20mmHg (2-4%) à 10SA à >50mmHg (10%) à 12SA. Ainsi, si cette modification de la pression partielle en oxygène n'explique pas les phénomènes mal connus de la constitution de la première invasion qui aboutit à la constitution de la coque trophoblastique et des bouchons trophoblastiques, une persistance d'une condition hypoxique dans la chambre intervillieuse ne pourra qu'être délétère pour la poursuite de la seconde phase d'invasion. De plus, la non transformation des artères spiralées et le maintien de leur réactivité aux substances vaso-actives augmentera les turbulences circulatoires de la chambre intervillieuse, et augmentera le niveau de stress oxydatif. Ainsi, il est fréquent d'observer des lésions placentaires qui témoignent de ceci, à savoir des dépôts fibrinoïdes intervilloux, des infarctus ou des thromboses villositaires et des lésions d'athérome des artères spiralées (De Wolf, Robertson et al. 1975; Meekins, Pijnenborg et al. 1994).

Cependant, l'hypoxie placentaire ne peut être tenue pour seule responsable nous observons souvent discordances entre le tableau clinique maternel et le tableau clinique fœtal. Il n'est pas rare qu'une mère présente un tableau de toxémie très marqué avec défaillance polyviscérale alors que son fœtus n'a pas souffert d'ischémie, et vice-versa. On peut probablement considérer que l'invasion placentaire insuffisante est un facteur de risque majeur de développer une toxémie

gravidique, mais que des facteurs autres (terrain maternel, capacité adaptative fœtale ?) vont modifier ce risque (Redman and Sargent 2005). Il est d'ailleurs étonnant de constater que les symptômes de toxémie gravidique peuvent apparaître du milieu du deuxième trimestre jusqu'à la fin de la grossesse. Ceci va dans le sens de la théorie la plus récente, la théorie « immuno-vasculaire ».

La théorie immuno-vasculaire ou « La grossesse, état inflammatoire »

Il est troublant de constater que de nombreux signes cliniques sont communs à la fin de grossesse normale et à la toxémie gravidique (Redman, Sacks et al. 1999). La fin de grossesse est la période où la somme des besoins métaboliques du fœtus est la plus importante. La toxémie gravidique est la période où il existe une désadaptation entre les besoins du fœtus et la réponse de l'organisme maternel. Certains des signes cliniques observés sont peut être un reflet d'une tentative d'adaptation fonctionnelle à ces besoins fœtaux. On remarque en effet une ré-ascention de la pression diastolique, une diminution du compte des plaquettes, une augmentation des marqueurs d'activation plaquettaire, une augmentation de l'hormone corticolibérine (CRH). La réponse inflammatoire en général est non spécifique et provoquée aussi bien par une lésion tissulaire que par une activation immunitaire. Elle se sert de voies non spécifiques incluant les réponses à monocytes et granulocytes mais aussi de l'activation de la voie du complément et du système de coagulation. La plupart des réponses inflammatoires sont localisées et participent à des phénomènes de réparation. Le processus central est la présentation très importante à la surface des cellules endothéliales de molécules qui vont favoriser l'adhésion de leucocytes, stimulée par la thrombine ou l'histamine en quelques minutes ou par une endotoxine, l'interleukine 1 ou le $\text{TNF}\alpha$ en quelques heures.

Le syndrome inflammatoire généralisé est un état souvent rencontré dans les chocs septiques, qui entraîne des défaillances multiviscérales liées à une dysfonction endothéliale généralisée. Dans la toxémie gravidique, il existe également une dysfonction endothéliale. Dans les deux états, on

constate des concentrations élevées de facteur Von Willebrand, de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1 (PAI-1), de l'endothéline, ainsi qu'une augmentation du rapport thromboxane/prostacyclines. L'activation endothéliale est responsable des troubles de coagulation présents dans les deux pathologies ainsi que de la vasoconstriction provoquant l'hypoperfusion multiviscérale et de la microangiopathie parfois thrombotique (Redman, Sacks et al. 1999). Cependant, la toxémie gravidique semble être un état d'activation endothéliale plutôt limité, du moins au début, à quelques territoires, les patientes ne présentant pas toutes les mêmes atteintes, ce qui est à première vue difficile à intégrer à une théorie de réaction de l'organisme maternel au placenta. En effet, le placenta, par une invasion insuffisante des artères utérines (théorie vasculaire), provoquerait à un terme donné (déterminé par ?) une réaction inflammatoire (théorie immune) qui impliquerait un facteur circulant. Comment envisager alors des lésions rencontrées dans des parties spécifiques du corps ? Il est intéressant de noter que la toxémie gravidique touche le système vasculaire dans son ensemble (hypertension, coagulation intra-vasculaire disséminée) et trois principaux organes : les plexus choroïdes – qui régulent l'équilibre hydroélectrolytique du cerveau –, le rein et le foie. Et avec les surrénales (qui ne sont pas mentionnées comme organe cible de la toxémie gravidique), ces trois organes ont la particularité de présenter des *endothelia* fenestrés ! Ainsi, une dérégulation d'un facteur spécifique de ce type d'endothélium pourrait peut-être participer à la « spécialisation » des symptômes cliniques de la toxémie gravidique. D'autres part, les plexus choroïdes, le rein et le foie sont des organes où le débit vasculaire est particulièrement important, et où l'ischémie est de ce fait très rapidement « parlante » sur le plan lésionnel. Le débit coronaire, par des mécanismes réflexes, est préservé plus longtemps.

Quoi qu'il en soit, on pourrait imaginer que si toutes les grossesses se poursuivaient au-delà de leur terme, une toxémie gravidique surviendrait chez toutes les patientes enceintes. Et les patientes qui ont dépassé le terme de 42 SA donnent souvent naissance à des enfants « post-matures », dont on dit qu'il ont commencé à maigrir, dont la diurèse s'est effondrée, et dont les

échanges placentaires sont souvent précaires, avec des souffrances anoxiques plus fréquemment. Enfin, on peut aussi imaginer que l'hypoxie placentaire mais aussi le retentissement fœtal, à savoir l'état d'adaptation entre les apports fournis par ce placenta et les besoins du fœtus, puisse avoir un rôle dans le moment de survenue des signes de toxémie gravidique. Il se peut qu'un équilibre s'installe entre les demandes fœtales (signaux vers la mère via le placenta) et les possibilités du placenta (réponse de celui-ci), même en cas de placentation insuffisante en invasion. Mais à un moment donné - diminution des zones d'échanges placentaires par thrombose intervillieuse, croissance inappropriée du fœtus, ...- cet équilibre se rompt, laissant alors la toxémie gravidique s'installer.

Marqueurs de toxémie gravidique

Facteurs de risque

Il n'existe actuellement aucun traitement de la toxémie gravidique établie, et la seule thérapeutique est de programmer la naissance au meilleur moment pour la mère et son enfant. Malheureusement, souvent les patientes se présentent dans leur maternité de référence avec des signes maternels de gravité, la naissance ne peut pas avoir lieu après une éventuelle cure de corticoïdes à visée de maturation pulmonaire dont l'effet demande 48H de délai. De plus des enfants parfois très prématurés naissent parfois dans des structures de niveaux de soins non adapté à leur besoin, grevant leur pronostic ultérieur. Il serait intéressant de pouvoir bénéficier d'un marqueur sérique maternel précoce dans la grossesse.

Il existe bien sûr certains scores de risque qui, à partir de critères pré-conceptionnels (facteurs de risques) et des données de l'analyse des flux vasculaires foeto-maternels (doppler des artères utérines principalement), permettent de classer la patiente dans un groupe à risque. Les facteurs de risque préconceptionnels reprennent toutes les conditions qui vont altérer les étapes précoces du développement placentaire, à savoir une prédisposition à une dysfonction endothéliale, des

anomalies favorisant les thromboses –thrombophilies et maladies auto-immunes-, anomalies géniques ainsi que les raisons appelées immunologiques -court délai d'exposition au sperme paternel, primipaternité-. Ils sont présentés tableau 4.

| | Facteurs de risque |
|--|---|
| Liés à la fonction endothéliale | Obésité Résistance à l'insuline Hypertension chronique Diabète pré-existant ou gestationnel Infections maternelles Petit poids de naissance de la mère Age avancé |
| Liés à l'hémostase | Thrombophilie Polyarthrite rhumatoïde Lupus érythémateux disséminé |
| Géniques | Antécédents familiaux de toxémie gravidique Antécédent personnel de toxémie gravidique |
| Immunologiques | Temps court d'exposition au sperme paternel Primipaternité |

Tableau 2 : principaux facteurs de risque pré-conceptionnels de toxémie gravidique, groupés selon leur type.

D'après (Sibai, Dekker et al. 2005).

Le récepteur soluble au VEGF, sFlt-1, marqueur de toxémie

Comme nous l'avons vu en début de chapitre, le VEGF est un mitogène spécifique des cellules endothéliales qui joue un rôle clé dans la promotion de l'angiogenèse. L'épissage alternatif de Flt-1 conduit à l'expression d'une protéine endogène sécrétée appelée sFlt-1, qui n'a plus de domaine cytoplasmique et transmembranaire, mais qui garde le domaine de liaison au ligand, VEGF (Kendall and Thomas 1993; He, Smith et al. 1999). Ainsi, sFlt-1 peut antagoniser le VEGF circulant en s'y liant et empêcher l'interaction du VEGF avec ses récepteurs naturels. sFlt-1 se lie et antagonise aussi PlGF.

Des études in vitro ont confirmé qu'un excès de sFlt-1 induisait un état anti-angiogénique dans le sérum des femmes atteintes de pré-éclampsie, qui pouvait être levé par l'apport exogène de VEGF et de PlGF (Maynard, Min et al. 2003). Un excès de sFlt-1 isolé, administré à des rates enceintes, induit une albuminurie, une hypertension et des lésions histologiques rénales d'endothéliose glomérulaire. Cet effet passe par la neutralisation du VEGF et du PlGF circulant et par l'induction

d'une dysfonction endothéliale (Karumanchi and Stillman 2006). De plus, des taux abaissés de VEGF et de PlGF libres ont été retrouvés en même temps que des taux élevés de sFlt-1 dans la circulation des patientes toxémiques au moment des premiers symptômes (Koga, Osuga et al. 2003). Plus récemment encore, les taux circulants de VEGF et de PlGF libres ont été retrouvés abaissés, bien avant l'apparition des premiers signes cliniques (Polliotti, Fry et al. 2003; Taylor, Grimwood et al. 2003). VEGF stimule l'angiogenèse et aussi la vasodilatation par la production de NO et de prostacyclines (molécules dont les taux sont abaissés dans la pré-éclampsie) (He, Venema et al. 1999). De plus, un nombre significatif de patients cancéreux recevant des antagonistes du VEGF développent une hypertension et une protéinurie (Yang, Haworth et al. 2003) Une simple baisse de 50 % de la production rénale de VEGF chez des souris génétiquement modifiées suffit à entraîner des lésions d'endothéliose et une protéinurie (Eremina, Sood et al. 2003). Tous ces résultats suggèrent qu'un excès de sFlt-1, en neutralisant VEGF et PlGF, pourrait jouer un rôle central dans la pathogénie de la toxémie gravidique. Le rôle de l'hypoxie sur les trophoblastes dans cette production est probable. En effet, il a été démontré que des cultures de cytotrophoblastes en hypoxie produisaient beaucoup de sFlt-1, et que le VEGF libre devenait indosable dans ces conditions. Le dosage de PlGF diminuait nettement aussi par rapport à une condition contrôle. Ceci n'était pas le cas avec des cultures de cellules endothéliales de veine ombilicale, ni avec des fibroblastes extraits de placentas (Nagamatsu, Fujii et al. 2004). De même, des cultures d'explants placentaires en hypoxie produisent beaucoup plus de sFlt-1 que les contrôles normoxiques (Ahmad and Ahmed 2005). Cependant, le rôle de sFlt-1 dans le développement normal du placenta et dans la pseudo-vasculogenèse n'est pas clair. De plus, il n'a pas été rapporté d'anomalies de la coagulation (HELLP syndrome), d'œdème ni d'anomalies cérébrales (éclampsie) ou d'anomalie hépatique chez les animaux traités par sFlt-1, « seulement » l'apparition de la triade hypertension-œdème-protéinurie. D'autres facteurs produits par le

placenta agissant en synergie avec le sFlt-1 sont vraisemblablement impliqués dans le développement de cette dysfonction endothéliale généralisée.

Autre marqueur de dysfonction endothéliale : l'endogline

La dysfonction endothéliale survenant lors de la toxémie gravidique semble être une accentuation et un avancement dans le temps des phénomènes physiologiques survenant lors des grossesses normales vers le terme. Il est probable que les signes maternels détectés (oedèmes, hypertension, protéinurie) surviennent après une phase plus ou moins longue de dysfonction endothéliale « à bas bruit ». Ainsi, il semble intéressant de doser dans le sang maternel certaines molécules qui pourraient être marqueurs de survenue de toxémie gravidique. D'ailleurs, tous récemment, l'équipe de Karumanchi a montré que l'expression de l'endogline et de sa forme soluble (s-endogline) étaient toutes deux augmentées dans les placentas de patientes toxémiques, que le dosage de s-endogline était augmenté dans le serum des patientes toxémiques, de façon proportionnelle à la sévérité de la maladie. De plus, elle a montré que le traitement par la forme soluble de l'endogline inhibait la formation d'un réseau capillaire endothélial. Enfin, l'administration adénovirale de sFlt-1 associée à s-endogline à des rates gestantes provoquait l'apparition d'un syndrome très proche du HELLP syndrome, associé à un retard de croissance des rats (Venkatesha, Toporsian et al. 2006).

Récapitulatif

La toxémie gravidique est un désordre lié au placenta, celui-ci étant capable de sécréter des facteurs solubles responsables des manifestations cliniques maternelles. La cause « finaliste » de ces sécrétions placentaires n'est pas clairement identifiée, puisque tout ceci peut conduire à la mort maternelle avant la naissance du fœtus. Cependant, l'hypertension provoquée va dans le sens d'un accroissement de l'apport de sang vers le fœtus. Il existe une théorie « théorie de la survie du plus convenable », ou survie de l'enfant par rapport à sa mère, qui verrait dans la toxémie

gravidique une façon de privilégier le fœtus au détriment de sa mère. En terme de survie de l'espèce, ceci est peut être envisageable...

Au total, il est maintenant admis que le défaut d'envahissement et de modification des artères spiralées concourt grandement à l'établissement de la toxémie gravidique. Ceci permet de réconcilier de nombreuses théories anciennes, puisque le point de rencontre est alors la placentation insuffisante. De même, la progression de la pathologie, de l'asymptomatique au tableau « explosif » de la crise d'éclampsie, laisse penser qu'il existe sûrement un (des) facteur(s) qui fait passer les femmes enceinte d'un stade I infra-clinique à un stade II clinique. La meilleure connaissance de ce « switch » permettrait peut être de proposer aux patientes un traitement pour prolonger le stade I ...La figure 29 récapitule schématiquement les connaissances actuelles sur cette pathologie dépendante d'une glande endocrine provisoire...

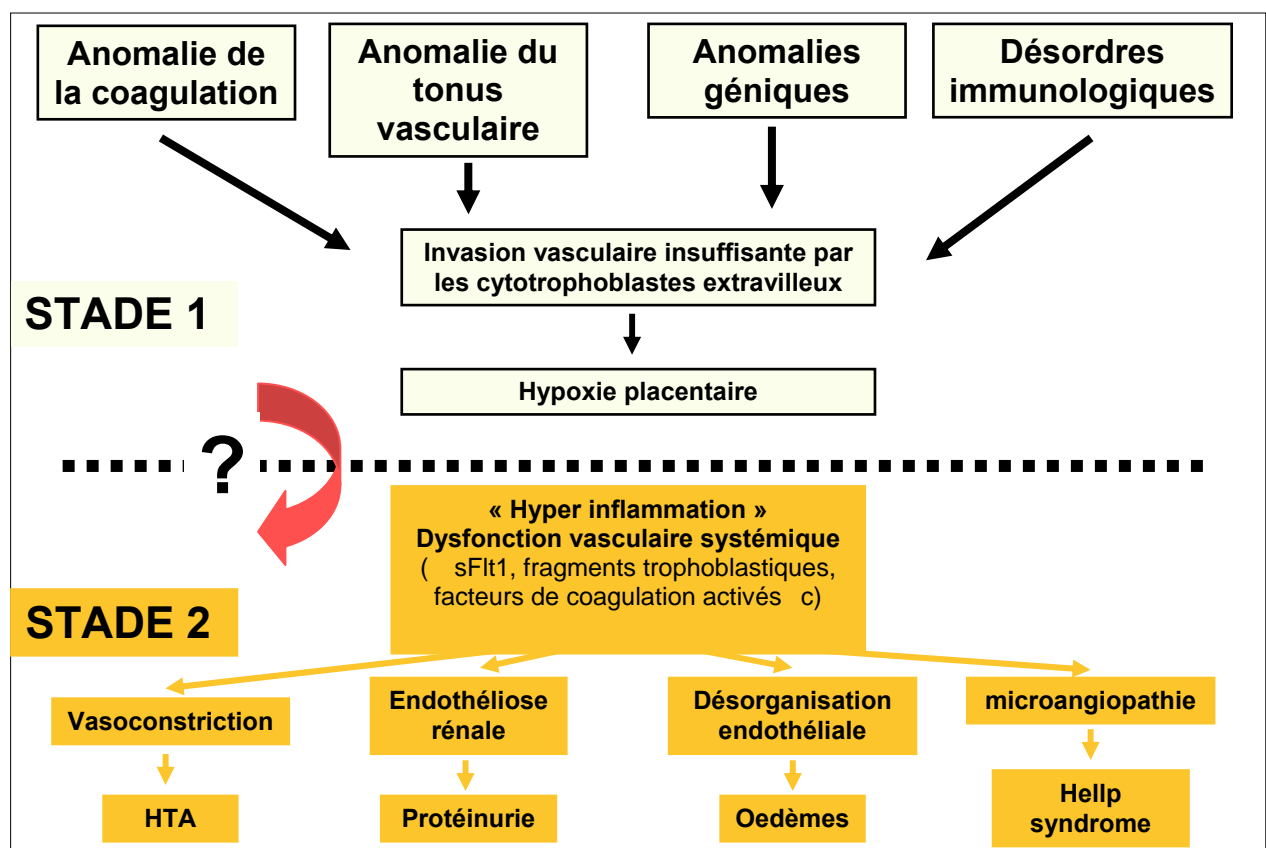


Figure 29 : schéma récapitulatif de la toxémie gravidique.

Evolution de la toxémie gravidique, débutant par une invasion vasculaire insuffisante par les trophoblastes extravilloux endovasculaires et interstitiels, se poursuivant par une phase de latence (adéquation apports maternels aux besoins fœtaux ?), et se finissant par la phase d'état associant diversement les signes, d'après Challier et Uzan, 2003.

LE EG-VEGF ET SES RECEPTEURS

Découverte d'un nouveau facteur angiogène spécifique des cellules endothéliales des glandes endocrines : le EG-VEGF

En 2001, l'équipe de N.Ferrara a publié la description d'un nouveau facteur angiogène, qui avait la particularité d'être spécifique de l'endothélium des glandes endocrines. Ceci ouvrait alors des perspectives quant à l'utilisation de thérapeutiques angiogènes ou anti-angiogènes plus ciblées, dont les effets systémiques seraient diminués (LeCouter, Kowalski et al. 2001). La stratégie employée par cette équipe pour la mise en évidence de ce facteur a été de tester la capacité d'une banque de protéines humaines sécrétées à induire la prolifération de cultures primaires de cellules endothéliales dérivées de capillaires de cortex surrénalien bovin (ACE). Ces cellules répondaient à un nombre limité de mitogènes, dont le VEGF et le *basic fibroblast growth factor* (bFGF), et une forte réponse était également obtenue avec une protéine de masse moléculaire relative de 8,6 K, codée par un ADN complémentaire (ADNc) cloné à partir d'une banque d'ovaire humain. Cet ADNc codait pour une protéine de 105 acides aminés (AA), avec un peptide signal bien défini. La protéine mature prédite avait 86 AA, dont 10 cystéines. Elle a été nommée EG-VEGF (Endocrine Gland Derived-VEGF) du fait de son activité biologique similaire à celle du VEGF sur les cellules endothéliales. En effet, le EG-VEGF induit la prolifération, la migration et l'apparition de discontinuités de membrane (fenestration) dans les ACE. Concernant la prolifération, cette réponse est trouvée spécifique des cellules endothéliales dérivées de glandes endocrines puisque absente sur les cellules endothéliales dérivées de veine ombilicale et de microvasculature de derme humain, de capillaires cérébraux et aortiques bovins, ainsi que sur d'autres types cellulaires participant au réseau vasculaire, à savoir les cellules de muscles lisses périvasculaires, les péricytes, les fibroblastes et enfin les kératinocytes. De même, la migration est stimulée sur les ACE et les cellules endothéliales dérivées de cortex surrénal de babouin à un niveau comparable à celle stimulée par VEGF, et dans les cellules endothéliales dérivées de micro-vaisseaux pancréatiques murins de façon plus marquée (et peut-être même inhibée à faible dose). En revanche, la migration n'est pas stimulée sur les cellules endothéliales dérivées de veine

ombilicale humaine. L'apparition fenêtres dans les cellules endothéliales ACE est observée après traitement par EG-VEGF de façon comparable à celle observée après traitement par VEGF. De plus, EG-VEGF et VEGF ont des effets additifs sur la fenestration. La similarité d'action de EG-VEGF et de VEGF est associée à une similarité de régulation, puisque l'expression de EG-VEGF est induite par l'hypoxie.

Le patron d'expression de EG-VEGF chez l'humain a été initialement décrit par northern-blot, et l'expression majoritaire a été retrouvée dans l'ovaire, le testicule, les surrénales et le placenta, donc principalement dans des glandes endocrines.

L'activité angiogène *in vivo* du EG-VEGF a été testée dans ce même article sur différents modèles. Aucune activité angiogène significative n'a été retrouvée dans le modèle de cornée de rat ou de lapin. En revanche, la délivrance intra-ovarienne par adénovirus de EG-VEGF a induit une angiogenèse marquée, ainsi qu'une apparition de kystes.

Ainsi, le EG-VEGF est un nouveau facteur, dont l'activité angiogène est limitée à l'endothélium des glandes endocrines.

Protéines homo- et orthologues

La connaissance de la séquence protéique complète de EG-VEGF a permis de réaliser que cette protéine était l'orthologue humain de protéines purifiées antérieurement par d'autres équipes sous d'autres appellations.

Un autre peptide très proche (60% d'homologie) a été découvert en 1999, isolé des sécrétions de grenouille *Bombina variegata*, de 8 kD, appelé pour ce fait Bv8 (Mollay, Wechselberger et al. 1999). Dans la suite d'autres peptides ont été isolés dans d'autres espèces.

Les appellations des protéines orthologues et homologues de EG-VEGF et de Bv8 sont présentées tableau 3.

| Famille | Nom | Espèce | Sites d'expression | Publication |
|----------------|-----------------------|------------------------------|---|--|
| EG-VEGF | Protéine A | Mamba noir | venin | (Joubert and Strydom 1980) |
| | MIT-1 | Mamba noir | venin | (Schweitz, Bidard et al. 1990; Schweitz, Pacaud et al. 1999) |
| | Prokinéticine 1 (PK1) | humain | placenta et glande surrénale principalement | (Li, Bullock et al. 2001) |
| Bv8 | Bv8 | Grenouille Bombina variegata | tractus intestinal et cerveau de mammifères | (Mollay, Wechselberger et al. 1999) |
| | Bv8m | Souris | principalement testicule, et spermatocyte | (Wechselberger, Puglisi et al. 1999) |
| | Prokinéticine 2 (PK2) | humain | intestin grêle et prostate principalement | (Li, Bullock et al. 2001) |

Tableau 3 : principales appellations des protéines apparentées à EG-VEGF et Bv8 fin 2003.

Ainsi, fin 2003, PK-1 et PK-2 avaient démontré une action sur la motricité intestinale mais aussi sur la survie neuronale (Melchiorri, Bruno et al. 2001) et le rythme circadien de la locomotion chez le rat (Cheng, Bullock et al. 2002). Le EG-VEGF était déjà plus qu'un facteur angiogène...

L'équipe de N.Ferrara avait caractérisé la structure primaire des orthologues humain et murin de Bv8, leur expression préférentielle dans le testicule des deux espèces, leur action angiogène (prolifération, survie et migration des ACE), leur régulation par l'hypoxie dans des cellules de tératocarcinome murin (P19). Par hybridation *in situ*, elle avait montré que les récepteurs dans le testicule se trouvaient dans les cellules endothéliales (LeCouter, Lin et al. 2003). De plus, la délivrance par un adénovirus du Bv8 murin intra-testiculaire avait induit une forte réponse angiogène *in vivo* à un niveau identique à la réponse induite par EG-VEGF.

Structure de EG-VEGF et des protéines apparentées

Des orthologues de EG-VEGF et de Bv8 humain ont été décrits dans des espèces variées, du poisson fugu au taureau. Elles ont toutes la caractéristique de présenter la même séquence amino-terminale AVIT, raison pour laquelle elles sont parfois appelées protéines de la famille AVIT. Les séquences déduites des ADNc des différentes espèces sont présentées dans le tableau 4.

| | | |
|-----|-------------------------------------|----|
| H1 | AVITGACERDVQCGAGTCCAISLWLRGLRMCTPL | |
| R1 | AVITGACERDVQCGAGTCCAISLWLRGLRLCTPL | |
| M1 | AVITGACERDIQCGAGTCCAISLWLRGLRLCTPL | |
| Mam | AVITGACERDLQCGKGTCCAVSLWIKSVRVCTPV | |
| Bom | AVITGACDKDVQCGSGTCCAASAWSRNIRFCIPL | |
| F1 | AVITGACERDVQCGLGLCCAVSLWLRGLRMCAPR | |
| H2 | AVITGACDKDSQCGGMCCAVSIWVKSIRICTPM | |
| M2 | AVITGACDKDSQCGGMCCAVSIWVKSIRICTPM | |
| R2 | AVITGACDKDSQCGGMCCAVSIWVKSIRICTPM | |
| B2 | AVITGACDRDPQCGGMCCAVSLWVKSIRICTPM | |
| F2 | AVITGACEKDSQCGGMCCAVSLWIRSLRMCTPM | |
| | | |
| H1 | GREGEETCHPGSHKVPFFR-KRKHHTCPCLPNLLC | |
| R1 | GREGEETCHPGSHKIPFFR-KRQHHTCPCSPSLLC | |
| M1 | GREGEETCHPGSHKIPFLR-KRQHHTCPCSPSLLC | |
| Mam | GTSGEDCHPASHKIPFSGQRKMHHTCPCAPNLAC | |
| Bom | GNSGEDCHPASHKVPYDG-KRLSSLCPCKSGLTLC | |
| F1 | GLEGEETCHPFSHKVPYPG-KRQHHTCPCLPHLVC | |
| H2 | GKLGDSCHPLTRKVPFFG-RRMHHTCPCLPGLAC | |
| M2 | GQVGDSCHPLTRKVPFWG-RRMHHTCPCLPGLAC | |
| R2 | GQVGDSCHPLTRKVPFWG-RRMHHTCPCLPGLAC | |
| B2 | GKVGDSCHPMTRKVPFLG-RRMHHTCPCLPGLAC | |
| F2 | GREGDDCHPMSHTVPFFG-KRLHHTCPCLPNLSC | |
| | | |
| H1 | SRFPDGRYRCSMDLKNINF | 86 |
| R1 | SRFPDGRYRCSQDLKNVNF | 86 |
| M1 | SRFPDGRYRCFRDLKNANF | 86 |
| Mam | VQTSPKKFKCLSK | 80 |
| Bom | SKSGE-KFKCS | 77 |
| F1 | TRDRDSKYRCTDDFKNVLDLYEVGQTLR | 94 |
| H2 | LRTSFNRFCIQAQK | 81 |
| M2 | LRTSFNRFCIARK | 81 |
| R2 | LRTSFNRFCIARK | 81 |
| B2 | SRTSFNRYTCIQAQK | 81 |
| F2 | IPMDEGRAKCLSTYKYPDYLL | 88 |

Tableau 4: séquence des acides aminés des protéines AVIT matures dans différentes espèces. Le 1 fait référence aux apparentés à EG-VEGF (PK-1) et le 2 fait référence aux apparentés à Bv8 humain (PK-2). H= humain, B= taureau, R= rat, M= mouse, Mam= black mamba, Bom = bombina variegata, F= fugu. D'après (Kaser, Winklmayr et al. 2003).

Les identités entre les différentes protéines de grenouille, de poisson, de serpents et des différents mammifères sont très grandes, en particulier dans la région centrale et N-terminale. Les

différences portent principalement sur les régions C-terminales, ce qui laisse supposer qu'elles ont moins d'effet sur les fonctions biologiques.

Ces protéines sont sécrétées sous forme de pré-protéines, avec un peptide signal. Dans les différentes espèces (à l'exception du poisson fugu qui possède des peptides signal particuliers), on retrouve encore une similitude entre les peptides «signal» selon qu'il s'agit d'une protéine apparentée à EG-VEGF ou à Bv8 humain. Dans le dernier cas, le peptide signal est plus long (Kaser, Winklmayr et al. 2003).

La structure tridimensionnelle de MIT-1 a été résolue en Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Elle se rapproche énormément d'une protéine retrouvée dans l'appareil digestif, la colipase (de porc dans ce travail), dont la séquence peptidique comprend également 10 cystéines. Leur structure tridimensionnelle est présentée figure 30 (Boisbouvier, Albrand et al. 1998).

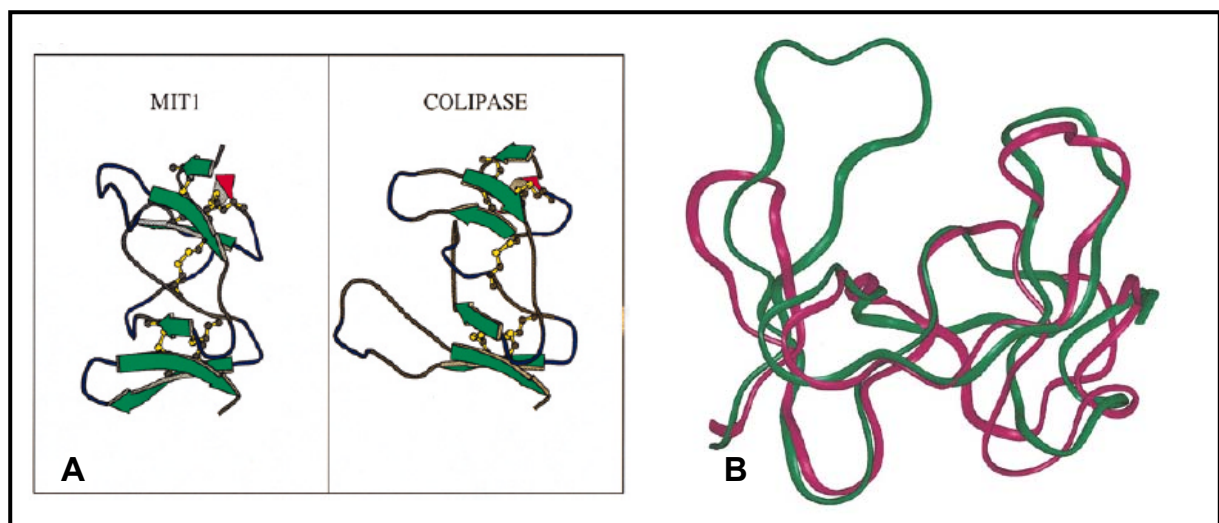


Figure 30: Structure tridimensionnelle de MIT-1 et de la colipase.

A = diagramme de Ribbon de MIT-1 et de la colipase de porc. En rouge sont représentées les hélices, en vert les brins et en noir les feuillets β . B = comparaison des deux structures, qui se superposent pour 61% de leur structure carbonée d'après (Boisbouvier, Albrand et al. 1998).

Les deux structures contiennent une région centrale de feuillets β groupés par des ponts disulfures de laquelle protudent 4 doigts. Cependant, leurs surfaces électrostatiques sont dissimilaires. MIT-1 présente la particularité d'avoir une face chargée positivement et de l'autre côté une poche

chargée négativement. Il n'existe pas à ce jour de structure proposée pour le EG-VEGF et le Bv8, mais il est possible qu'ils présentent une structure proche de celle de MIT-1 car leur séquence peptidique est proche et leurs cystéines réparties de la même façon, laissant supposer que les ponts disulfures pourraient avoir la même disposition.

Il est maintenant bien établi que EG-VEGF et PK-1 ont la même séquence peptidique, et que Bv8 humain et PK-2 également. D'autre part, il existe probablement des isoformes pour EG-VEGF (PK-1) et Bv8 humain (PK-2) puisque dans leur article *princeps* de description des prokinétines humaines, Li *et al* remarquent en northern blot qu'ils retrouvent deux tailles d'ARNm, à 1,5 et 1,8 kbp pour PK-1 (Li, Bullock et al. 2001) et que dès 1999, Wechselberger *et al* caractérisaient deux formes d'ARNm de Bv8 dans le testicule humain, dont l'une codait pour une forme plus longue de 21 AA principalement basiques (Wechselberger, Puglisi et al. 1999).

Récepteurs de EG-VEGF et de Bv8

La firme pharmaceutique Takéda, travaillant sur la mise en évidence de ligands pour des RCPG, a mis en évidence un ADNc « full-length » codant pour un RCPG orphelin nommé ZAQ, présentant une grande homologie avec le RCPG murin GPR73 et le RCPG orphelin humain I5E. ZAK a été cloné dans des cellules CHO. Il se trouvait structurellement proche du récepteur au neuropeptide Y mais ne répondait pas aux neuropeptides connus. Un essai mesurant par luminescence la mobilisation de calcium intracellulaire a permis de montrer que le peptide ligand pour ZAK se trouvait présent dans du lait de vache. La purification successive de celui-ci par HPLC a finalement permis de démontrer que EG-VEGF était le ligand pour ZAK (Masuda, Takatsu et al. 2002). Au moment de la sortie de l'article, l'équipe qui avait mis en évidence PK-1 et PK-2 en 2001 (Li, Bullock et al. 2001) en suggérant que leurs récepteurs étaient couplés à des protéines G, a testé - par transfection dans des cellules C.H.O - la mobilisation du calcium intracellulaire par différents ADNc humains de nouveaux membres de la famille des Récepteurs Couplés à des Protéines G (RCPG) en réponse à de la PK-1 recombinante (50nM) (Lin, Bullock et al. 2002).

Seuls deux récepteurs ont médié une réponse dans ces conditions. Ils présentaient 80% d'identité avec un récepteur orphelin décrit chez la souris, le GPR73. Les deux récepteurs ont été nommés GPR73a et b, puis PKR-1 et -2 (Prokineticin Receptor-1 et -2) respectivement. Dans cet article d'identification, l'équipe a montré que les deux récepteurs avaient 85% d'homologie de leur séquence en AA, avec une divergence surtout dans leur partie extracellulaire N-terminale. Les deux récepteurs étaient activés par les deux prokinéticines recombinantes, avec des EC50 différentes. Ainsi, le PKR-1 est plus facilement activé par le PK-1 ($EC_{50} = 2,2 \pm 0,7$ nM) que par le PK-2 ($EC_{50} = 4,3 \pm 1,3$ nM), et plus facilement activé que le PKR-2 (EC_{50} pour PK-1 = $7,0 \pm 1,8$ nM, EC_{50} pour PK-2 = $7,3 \pm 2,8$ nM). De plus, le PKR-2 est activé de la même façon par les deux prokinéticines. Cette équipe a également trouvé que la mobilisation calcique induite par PK-1 et PK-2 dans les cellules CHO transfectées par les ADNc de PKR-1 et -2 n'était pas modifiée par le traitement par la toxine pertussique, indiquant que la protéine G couplée aux récepteurs des prokinéticines devait être une protéine Gq.

L'expression tissulaire de ces récepteurs, étudiée par PCR est différente. Le PKR-1 est retrouvé dans le système digestif, le cerveau, la rate, la prostate, le testicule, l'intestin grêle, les leucocytes, le pancréas, la surrénale, la glande thyroïde, les glandes salivaires et l'hypophyse ; il n'est pas retrouvé dans l'ovaire. A l'inverse, le PKR-2 est retrouvé seulement dans la charnière iléocaecale et l'intestin grêle, le cerveau, le testicule et l'ovaire, la glande thyroïde, les glandes salivaires et l'hypophyse.

Enfin, une autre équipe de l'industrie pharmaceutique a confirmé dans des essais fonctionnels que PKR-1 et -2 répondaient aux prokinéticines de façon concentration-dépendante. La localisation tissulaire retrouvait PKR-1 dans le testicule, la *medulla oblongata* (zone du système nerveux située entre la moëlle épinière et le cerveau), le muscle squelettique et la peau, alors que le PKR-2 était retrouvé principalement dans le système nerveux central (Soga, Matsumoto et al. 2002).

En 2003, l'équipe de Ferrara a montré que, dans le testicule humain, le PKR-1 était plus exprimé, alors que les deux formes se retrouvaient à des niveaux identiques dans le testicule de souris (LeCouter, Lin et al. 2003).

Les voies de signalisation des récepteurs PKR-1 et PKR-2

L'équipe de N.Ferrara a exploré en 2002 les voies de signalisation induite par EG-VEGF/PKR-1 dans les cellules endothéliales de capillaire de cortex surrénal ACE (LeCouter, Lin et al. 2002).. Elle a montré que le EG-VEGF induisait la phosphorylation des MAP Kinases p44 et p42 (ERK1 et ERK2), de façon temps dépendant (maximum à 10 minutes) et dose dépendante (maximum à 20nM), cette phosphorylation étant bloquée par l'ajout d'un inhibiteur de la kinase de la kinase MAP. Cette activation des MAP Kinases p44 et p42 est indépendante du VEGF. Contrairement à ce qui avait été montré par Li *et al* (Li, Bullock et al. 2001), l'effet du traitement par EG-VEGF sur les ACE est sensible au traitement par pentoxifylline (inhibiteur non spécifique de la phosphodiesterase), laissant penser que le récepteur médiant cet effet serait plutôt un récepteur couplé à une protéine Gi qu'un récepteur tyrosine kinase. L'équipe de N.Ferrara a montré également que le EG-VEGF induisait la phosphorylation de Akt (ou kinase protéine-B), une sérine/thréonine kinase impliquée dans la prolifération cellulaire et l'angiogenèse, de façon PI3-kinase dépendante. De plus, le traitement des ACE par EG-VEGF les protège de l'apoptose induite par la déprivation de sérum. Enfin, le EG-VEGF phosphoryle le NO-synthase endothéliale, la rendant active, et ce de façon PI3-kinase dépendante. Au total, l'activation de la voie des MAP Kinases est essentielle à la prolifération et à la migration des ACE.

En 2002, dans leur publication d'identification des récepteurs des prokinéticines, Lin *et al* ont montré que dans des cellules HEK293 (cellules de rein d'embryon humain) exprimant de façon stable l'un ou l'autre des deux récepteurs PKR-1 ou -2, le traitement par EG-VEGF ou Bv8 humain induisait également une phosphorylation des MAP Kinases p44 et p42 (Lin, Bullock et al. 2002). Les réponses étaient différentes selon le récepteur et le ligand testé. Ainsi, via PKR-1, la

phosphorylation induite par EG-VEGF/PK1 est très rapide (3 minutes) et très marquée comparée à celle obtenue via PKR-2. A l'inverse, la phosphorylation induite par le Bv8/PK2 est plus importante dans les cellules exprimant le PKR-2, mais moins intense et moins soutenue. Ceci est en faveur d'un rôle de PK-1 plus important que celui de PK-2 dans l'angiogenèse où cette voie est prépondérante, et peut-être également un rôle angiogène plutôt médié par PKR-1 que par PKR-2.

EG-VEGF et Bv8 : différence humain/souris

Il est toujours utile, afin de pouvoir approfondir des connaissances sur un nouveau facteur, de pouvoir disposer de connaissances sur la souris, celle-ci étant un moyen précieux de faire des études géniques ciblées. Dans cette optique, l'équipe de N.Ferrara a décrit en 2003 le patron d'expression de EG-VEGF murin (LeCouter, Lin et al. 2003). Ils ont confirmé que le patron d'expression de ce facteur était très différent de celui observé chez l'homme. En effet, EG-VEGF était principalement exprimé par le foie et le rein, et retrouvé très faiblement exprimé dans l'ovaire et le testicule. Cette équipe ne l'a pas retrouvé exprimé dans le cerveau murin, et ne l'a pas étudié en RT-PCR quantitative dans le tractus digestif. Elle avait déjà publié l'expression du Bv8 murin (LeCouter, Lin et al. 2003) et retrouvait une expression préférentielle dans le testicule. L'expression des deux récepteurs, étudiée par RT-PCR semi-quantitative également, était différente, le PKR-1 se trouvant principalement dans l'ovaire, le testicule, la prostate et l'embryon de 15 jpc et le PKR-2 étant principalement exprimé dans le cerveau (bien que PK-1 et PK-2 n'y aient pas été détectés par RT-PCR), la prostate, l'embryon de 7 jpc et la prostate. Dans le foie et le rein murin, EG-VEGF est beaucoup plus exprimé dans la fraction déplétée en cellules endothéliales, alors que les récepteurs PKR-1 et -2 sont majoritairement exprimés dans les cellules endothéliales. Ainsi, comme chez l'humain, les récepteurs sont exprimés par les cellules endothéliales et les ligands par le tissu alentour.

Les gènes de EG-VEGF et Bv8 humains et murins sont synténiques, leurs structures sont très conservées mais il existe une différence fondamentale dans leurs régions promotrices, qui

explique probablement pourquoi la distribution est si différente dans les deux espèces : chez l'humain existe un site de liaison consensus pour le récepteur nucléaire NR5A1. NR5A1 est considéré comme un régulateur clé du développement et du fonctionnement endocrine, il régule de nombreux gènes de la stéroïdogénèse. De plus, dans l'ovaire, NR5A1 (et NR5A2) sont exprimés dans les follicules et le corps jaune de façon déterminée dans le temps, indiquant qu'ils pourraient être des régulateurs de l'expression de EG-VEGF (LeCouter and Ferrara 2003).

EG-VEGF en gynécologie

Les ovaires sont un lieu où chez l'adulte l'angiogenèse est présente de façon physiologique. En effet, lors d'un cycle menstruel, la folliculogénèse ovarienne va permettre le développement d'une véritable glande endocrine (et exocrine par libération de l'ovocyte) temporaire. Dès le début du cycle, une stéroïdogénèse va prendre place dans une petite cohorte de follicules ovariens, puis le follicule dominant va être seul responsable de la production d'estrogènes, sous dépendance de la FSH (Follicle Stimulating Hormone). Autour du pic de LH (Luteinizing Hormone), une modification des cellules de la thèque interne du follicule dominant (lutéinisation) va permettre la production de progestérone. Ces modifications vont former le corps jaune (ou *corpus luteum*) (figure 31). En son sein va se développer une angiogenèse marquée. En cas de grossesse, cette glande transitoire va persister chez l'humain jusqu'à la fin du premier trimestre. La stéroïdogénèse ovarienne, d'abord estrogènes, puis progestérone, va permettre le développement de l'endomètre maternel. En première phase de cycle, l'endomètre subira une phase de prolifération globale (glandes, stroma, vaisseaux endométriaux). En deuxième phase de cycle, l'endomètre subira une phase de maturation, avec transformation des glandes en glandes sécrétantes et transformation des artères endométriales qui deviennent très tortueuses et deviennent alors les artères spiralées (figure 32).

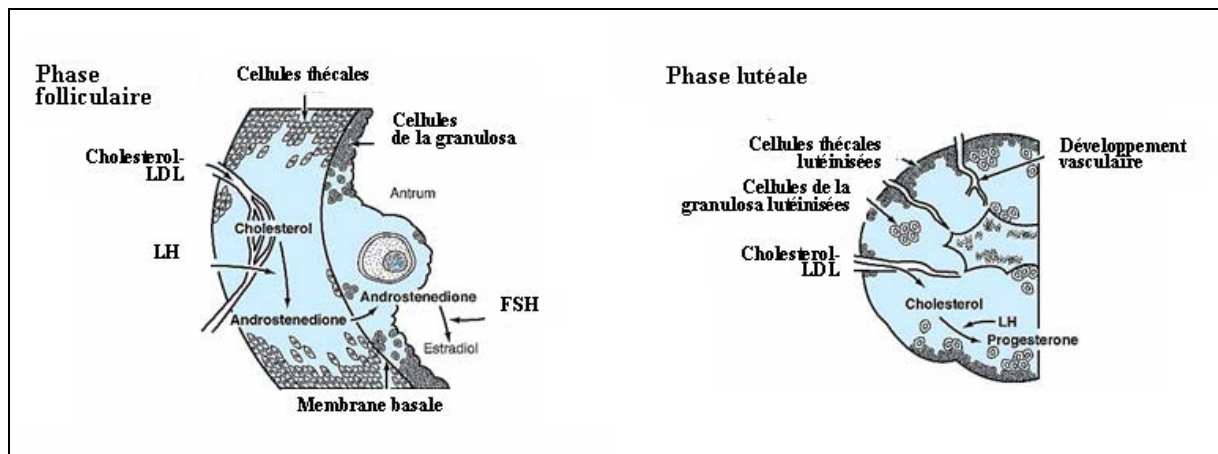


Figure 31 : représentation schématique de la stéroïdogénèse ovarienne au sein des deux compartiments folliculaires.

Les cellules de la granulosa sont sous dépendance principale de la FSH, et les cellules thécales, sous dépendance principale de la LH/HCG. A noter, après l'ovulation le corps jaune devient une glande très richement vascularisée (la moitié de ses cellules sont alors des cellules endothéliales).

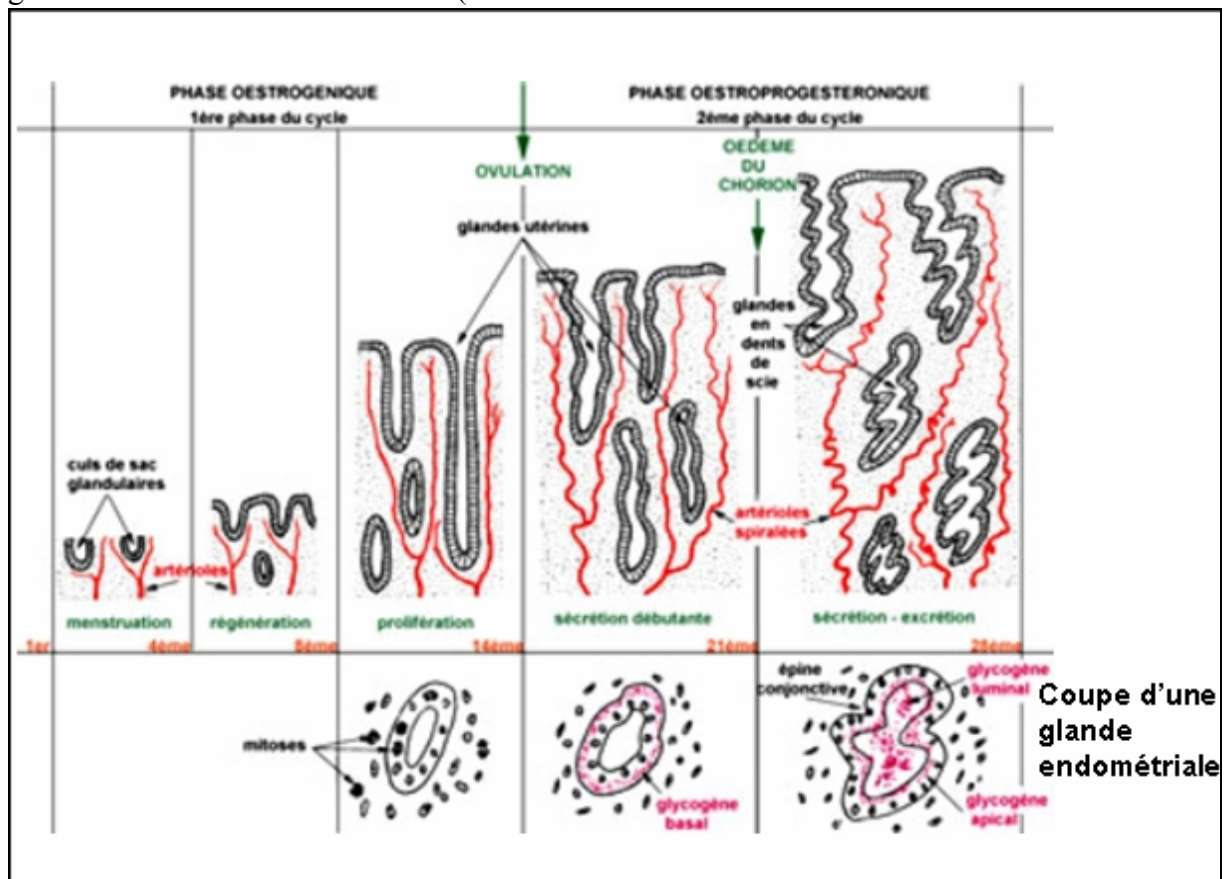


Figure 32 : schéma récapitulatif du cycle menstruel endométrial, montrant la transformation finale des artères spiralées.

Modifié d'après http://wikipédia.org/Cycle_menstruel#Endom.

A l'heure où j'ai débuté mon travail de thèse, sur 22 articles concernant le EG-VEGF/PK-1 ou les prokinétines publiés, seuls trois articles concernaient la gynécologie. Bien sûr, dans sa

description initiale, N. Ferrara et son équipe avaient regardé l'expression de EG-VEGF par hybridation *in situ* dans l'ovaire et montré l'apparition de kystes et d'une hypervascularisation par délivrance adénovirale intra-ovarienne (LeCouter, Kowalski et al. 2001). Mais ceci restait une description sommaire.

Par la suite, en 2003 toujours, trois nouveaux articles exploraient les patrons d'expression, les régulations et l'implication du EG-VEGF dans l'ovaire, en condition normale ou pathologique de façon plus précise.

Le premier par ordre chronologique a caractérisé l'expression du EG-VEGF dans les carcinomes ovariens (Zhang, Yang et al. 2003). Bien que ceci ne soit pas précisé, il s'agissait probablement de carcinomes d'origine épithéliale, carcinomes ovariens les plus fréquents. Zhang *et al* ont montré en RT-PCR quantitative que l'ARNm du EG-VEGF était moins exprimé dans les tumeurs ovariennes, quelque soit leur stade, que dans le tissu ovarien normal. Ils n'ont pas retrouvé de corrélation du niveau d'expression du EG-VEGF avec la survie. Ils ont cependant montré que le niveau d'expression diminuait avec l'avancée du stade de la maladie. De façon intéressante, ils ont constaté, par PCR sur cellules microdisséquées au laser, que l'expression du EG-VEGF était plus importante dans le stroma péri tumoral que dans les îlots tumoraux eux-mêmes. Malheureusement, ils n'ont fait cette analyse que sur des tumeurs de stade avancé (stade III). Nous ne savons pas si ce niveau d'expression n'aurait pas été encore plus élevé dans le stroma des tumeurs de stade précoce (stade I). Ils ont conclu que le EG-VEGF pourrait être une cible anti-angiogène dans les stades précoces du carcinome ovarien. Malheureusement, ces stades sont peu fréquents car le cancer ovarien est de diagnostic tardif, de par sa localisation.

Le second article, publié par N.Ferrara (Ferrara, Frantz et al. 2003) concernait l'expression de VEGF et de EG-VEGF dans des ovaires normaux ou appartenant à des patientes présentant un syndrome des ovaires polykystiques, syndrome dont la pathogénie reste peu claire. La symptomatologie se caractérise par des troubles de l'ovulation allant jusqu'à l'anovulation, des

troubles de la sécrétion des stéroïdes ovariens avec une hyper androgénie, et à l'échographie une augmentation de la vascularisation du stroma ovarien et la présence de nombreux kystes périphériques. Par hybridation *in situ*, l'équipe de N.Ferrara a observé que les patrons d'expression de VEGF et de EG-VEGF dans l'ovaire étaient complémentaires tout au long du cycle menstruel, tant en phase folliculaire qu'en phase lutéale. Le EG-VEGF se trouvant présent dans les follicules primordiaux et primaires, alors que le VEGF ne l'est pas, participerait peut-être au recrutement folliculaire initial. Ensuite le marquage EG-VEGF est très marqué dans les follicules atreétiques, qui ont participé au recrutement cyclique mais n'ont pas obtenu la «dominance» (voir figure 33). On peut imaginer que le EG-VEGF pourrait jouer un rôle dans l'établissement de la dominance ovarienne chez la femme... Dans le corps jaune, le VEGF est exprimé pendant la phase lutéale précoce, lorsque le recrutement et développement vasculaire sont majeurs, puis disparaît en milieu de phase lutéale. Le EG-VEGF devient alors prépondérant, principalement dans la vascularisation qui se développe dans les cellules de la thèque interne. Un autre trait intéressant retrouvé dans les ovaires normaux est le fort marquage du hile ovarien par le EG-VEGF. Les cellules de cette zone sont considérées comme l'équivalent des cellules de Leydig testiculaires chez l'homme. Malheureusement, il n'a pas été réalisé d'hybridation *in situ* pour le Bv8. Dans les ovaires de femmes porteuses du syndrome des ovaires polykystiques, le patron d'expression de VEGF et EG-VEGF est différent. Ces patientes sont le plus souvent en aménorrhée, par arrêt de maturation des follicules antraux. Le marquage de VEGF a été retrouvé dans la couche des cellules de la granulosa, et le marquage de EG-VEGF dans les cellules de la thèque. Bien que le fait ne soit pas établi, il pourrait s'agir d'un phénomène découlant du marquage par EG-VEGF des follicules atreétiques d'ovaires normaux. Ainsi, les follicules marqués par EG-VEGF jusqu'à un stade antral ne rentrent pas en croissance et restent « bloqués ». Au total, cette étude permet de supposer un rôle complémentaire de VEGF et EG-VEGF dans l'angiogenèse physiologique ovarienne, avec pour chacun un type cellulaire folliculaire privilégié.

Les cellules de la granulosa sont principalement stimulées par la FSH. Il a été montré que l'expression du VEGF était augmentée par le traitement par FSH et LH de cellules issues de carcinome séreux et cellules issues de tumeurs border-line transformées (Wang, Luo et al. 2002). Par ailleurs, il a été montré que la production de VEGF était augmentée dans des cultures de cellules de la granulosa obtenues lors de ponctions ovocytaires pour fécondation *in vitro* (FIV) traitées par gonadotrophines (Lee, Christenson et al. 1997) (Neulen, Raczek et al. 1998) (Agrawal, Jacobs et al. 2002). D'autre part, les cellules de la thèque sont principalement sensibles à la LH (ou HCG par analogie de structure) et il est probablement intéressant de tester l'effet de cette(ces) hormone(s) sur l'expression du EG-VEGF.

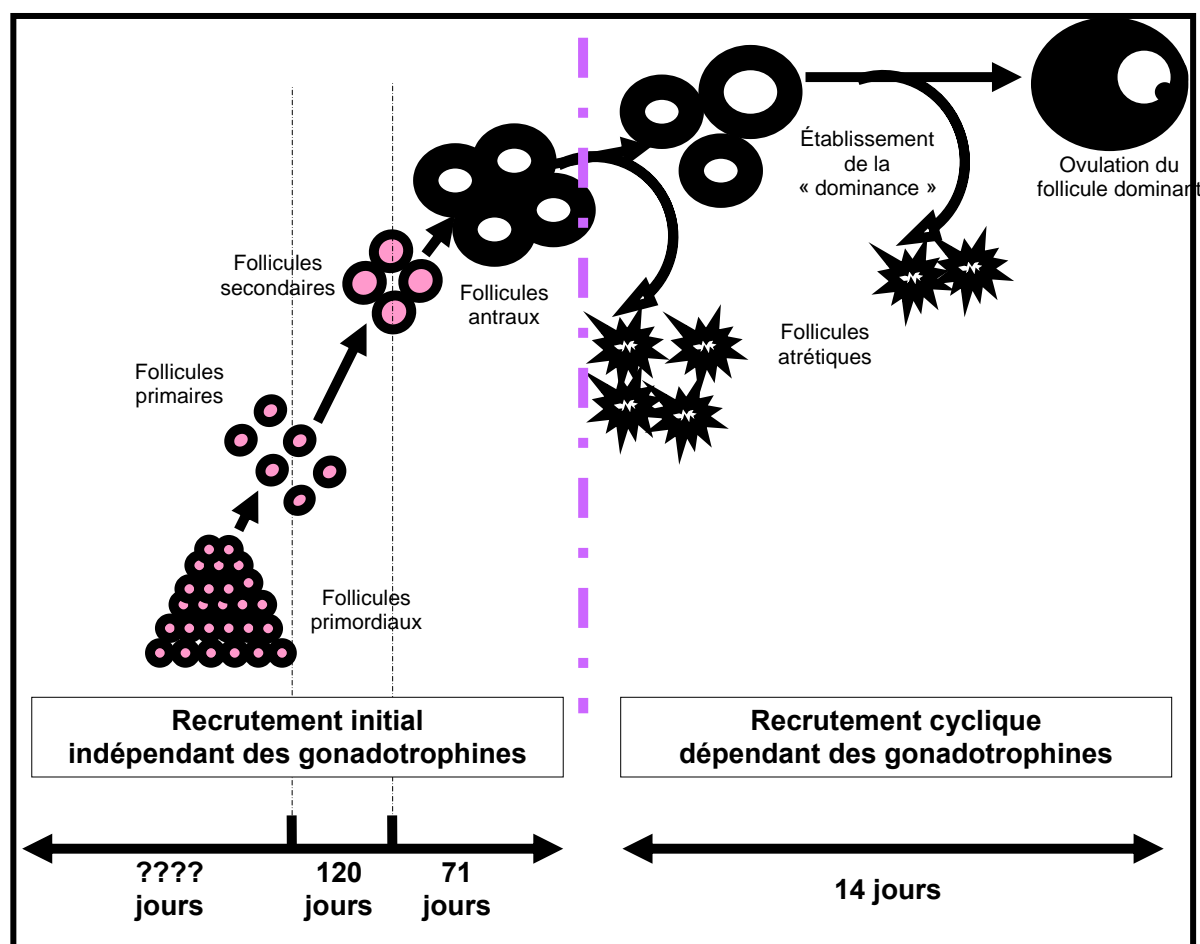


Figure 33 : schéma des deux phases de recrutement folliculaire ovarien amenant chez l'humain à la maturation et à l'ovulation d'un follicule dominant
d'après (McGee and Hsueh 2000).

Dans le troisième article, Kisliouk *et al* ont étudié l'expression et la régulation de EG-VEGF/PK-1 et de ses récepteurs dans les cellules ovariennes, et plus précisément les cellules folliculaires,

différenciant les cellules stéroïdogènes et les cellules endothéliales (Kisliouk, Levy et al. 2003). Sur des cellules de granulosa lutéinisées obtenues lors de ponction ovocytaire pour FIV et une lignée de cellules de granulosa lutéinisées transformées, les SVOG, ils ont montré que le EG-VEGF est exprimé. Dans les SVOG, il est régulé positivement par la forskoline de façon dose-dépendante, régulé de façon négative par une hypoxie chimiquement induite et le traitement par la thrombine. Le VEGF quant à lui est régulé de façon inverse. Le fait que l'hypoxie n'induit pas l'expression de EG-VEGF comme ceci avait été montré dans les ACE est surprenant. Cependant, ceci est en accord avec les hybridations in situ effectuées par Ferrara et son équipe, qui avait trouvé un marquage prédominant dans les cellules thécales du corps jaune (Ferrara, Frantz et al. 2003). De plus, Kisliouk et son équipe ont montré que l'expression des deux types de récepteurs dans les deux types cellulaires est différente, l'expression dans les cellules bovines de la thèque étant deux fois plus abondante. Un autre fait intéressant mis en exergue par Kisliouk *et al* dans ce travail est que l'expression du EG-VEGF est corrélée de façon positive avec la stéroïdogénèse. De plus, PKR-1 a été mis en évidence dans les cellules humaines de granulosa lutéinisées et dans les cellules stéroïdogènes de corps lutéal bovin. Ceci a ouvert la perspective d'un rôle non seulement angiogène de EG-VEGF dans le corps jaune, mais également à un rôle en lien avec la stéroïdogénèse ovarienne.

PARTIE II : RESULTATS

Au moment où j'ai débuté mon travail de thèse, EG-VEGF/PK-1 et Bv8/PK-2 étaient tous les deux connus. L'action angiogène de ces deux cytokines était bien mise en évidence. Le EG-VEGF avait fait preuve de son action angiogène spécifique sur l'endothélium des glandes endocrines. Le Bv8 avait prouvé son action angiogène sur des cellules ACE, mais pas la spécificité de cette action sur les *endothelia* de glandes endocrines. La régulation de l'expression de EG-VEGF par l'hypoxie avait été montrée.

Certaines voies de signalisation, activation de la voie des MAP Kinases, de Akt, étaient connues. Les récepteurs, PKR-1 et PKR-2, étaient également connus, même si la controverse persistait quant au type de protéine G auquel ils s'associaient. En effet, Li et al ont montré que la mobilisation calcique provoquée par PK-1 et -2 n'était pas modifiée par la toxine pertussique, évoquant un couplage à une protéine Gq, alors N.Ferrara et son équipe ont montré plus tard que l'activation des MAP Kinases par le EG-VEGF était sensible à la pentoxifilline, évoquant un couplage à une protéine Gi.

Les distributions tissulaires de EG-VEGF/PK1 et Bv8 était différentes entre elles, mais également selon les espèces et les auteurs. Il existait cependant un consensus concernant les ovaires et les testicules. Les patrons d'expression des récepteurs étaient également très différents l'un de l'autre, même si dans les glandes endocrines les récepteurs se trouvaient dans l'endothélium.

L'expression de EG-VEGF dans le placenta humain avait été montrée par deux équipes, mais leurs récepteurs dans celui-ci n'avait pas été mise en évidence par la RT-PCR qui avait été faite.

Objectifs du travail

Dans ce contexte, il nous a semblé intéressant de préciser le patron d'expression spatio-temporelle de EG-VEGF et de ses récepteurs PKR-1 et -2 dans le placenta. Nous savions que l'hypoxie régulait l'expression de EG-VEGF et il était alors tentant d'étudier les variations d'expression en fonction du terme de la grossesse. En effet, comme nous l'avons présenté dans les parties concernant le développement du placenta humain et murin, il existe d'abord un développement placentaire en hypoxie, puis une augmentation de la pression en oxygène dans la chambre intervillieuse chez la femme et dans le labyrinthe chez la souris. Chez l'humain, la disparition des bouchons trophoblastiques se fait progressivement entre la 8^{ème} et la 12^{ème} SA en parallèle de la transformation des artères spiralées. Chez la souris, le « switch » intervient après le 10,5^{ème} jpc. De plus, les cellules trophoblastiques humaines sont connues pour acquérir des caractéristiques endothéliales au cours du développement placentaire, et nous avons supposé que le EG-VEGF pourrait avoir un fonction biologique sur elles..

Pour l'étude chez l'humain, nous avons ciblé le premier trimestre de la grossesse pour plusieurs raisons. D'abord car les changements d'oxygénation de la chambre intervillieuse surviennent entre 8 et 12 SA, et nous pensions que le premier trimestre était donc la période idéale pour étudier les éventuelles modifications d'expression de EG-VEGF et de ses récepteurs. Ensuite car la toxémie gravidique étant une pathologie placentaire dont le *primum movens* est une anomalie précoce du développement placentaire, le premier trimestre nous semblait indiqué pour étudier l'expression de ce facteur et de ses récepteurs dans les conditions physiologiques d'abord. Enfin, il nous était possible d'obtenir des échantillons de placentas issus d'interruptions volontaires de grossesse entre 8 et 14 SA.

Le EG-VEGF étant un facteur dont l'action angiogène est spécifique de l'endothélium des glandes endocrines, nous avons pensé qu'il pourrait avoir un rôle plus ciblé que les autres facteurs angiogènes connus à ce jour dans la placentation, et qu'une dérégulation pourrait peut-être

participer à des défauts d'établissement placentaire et être impliquée dans la survenue d'une toxémie gravidique.

Il nous a semblé intéressant de pouvoir bénéficier d'un modèle animal de toxémie gravidique, et nous avons choisi la placentation murine car elle présente de nombreuses similitudes avec la placentation humaine. C'est pourquoi nous avons décidé d'étudier le patron d'expression spatio-temporelle de EG-VEGF et de ses récepteurs pendant la gestation murine en conditions physiologiques dans un premier temps.

Notre travail a donc consisté à établir le patron d'expression spatio-temporel de EG-VEGF et de ses récepteurs dans le placenta humain au cours du premier trimestre, et durant toute la gestation murine.

Dans la première partie, concernant le placenta humain, nous avons établi en PCR quantitative le patron d'expression de l'ARNm de EG-VEGF, de PKR-1 et PKR-2 entre 6 et 14 SA. Il n'existait alors pas d'anticorps anti-EG-VEGF commercial. Un anticorps développé à façon par la société Covalab (Lyon) nous a permis de localiser l'expression protéique de EG-VEGF au sein de la villosité placentaire, et sa variation au cours du temps, en immunohistochimie. Un western-blot nous a permis de confirmer les données de PCR. Par une approche indirecte, par PCR semi-quantitative sur culture cellulaire primaire de trophoblastes, nous avons recherché à quantifier l'expression des deux récepteurs dans ce type cellulaire car nous ne possédions alors pas d'anticorps. Nous avons aussi par la même technique, étudié les régulations de EG-VEGF et PKR-1 selon des modifications de pression d'oxygène des cultures.

Dans la deuxième partie de ce travail, concernant le placenta murin, nous avons également étudié le patron d'expression en ARNm de EG-VEGF, PKR-1 et PKR-2 dans différents tissus, dont le placenta à 9.5, 10.5, 14.5 et 17.5 jpc. Grâce à l'anticorps anti EG-VEGF, nous avons également étudié son patron d'expression protéique, en immunohistochimie et western-blot. Nous

bénéficiions alors des anticorps anti-PKR-1 et PKR-2 développés par Covalb (Lyon) et avons pu préciser les localisations des récepteurs au sein du placenta murin.

Nos résultats nous ont encouragé à étudier le rôle de EG-VEGF sur le développement placentaire ainsi, dans la troisième partie de ce travail, nous avons étudié l'effet du traitement par EG-VEGF sur des trophoblastes humains en culture en terme de prolifération, migration et invasion. Concernant son rôle éventuel sur l'invasion, nous avons utilisé le modèle de culture organotypique par culture d'explants placentaires en chambres de boyden couvertes de Matrigel®. Nous avons également analysé l'effet du traitement par EG-VEGF sur l'expression des proMMP-2 et -9 dans le surnageant de ces cultures. Enfin, grâce à une lignée transformée de trophoblastes extravilleux, HTR8-sVnéo, nous sommes en cours d'investigation du rôle de EG-VEGF sur les trophoblastes extravilleux, responsables de l'invasion interstitielle et de celle des artères spiralées.

Article 1

Expression and oxygen regulation of Endocrine Gland-Derived Vascular Endothelial Growth Factor/Prokineticin-1 and its receptors in human placenta during early pregnancy.

Pascale Hoffmann^{1,2}, Jean-Jacques Feige¹ and Nadia Alfaidy.¹

¹Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale, Equipe Mixte 01-05, Département Réponse et Dynamique Cellulaires, Commissariat à l'Energie Atomique. 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex, France. ²Service de Gynécologie, Obstétrique et Médecine de la reproduction, University Hospital of Grenoble. 38043 Grenoble cedex 9, France.

Abbreviated title: EG-VEGF expression and regulation in human placenta

Correspondance: Dr. Nadia ALFAIDY
INSERM EMI 01-05
DRDC/ ANGIO. CEA-Grenoble
17, Rue des Martyrs. 38054, Grenoble
Phone: (33) 4 38 78 44 64
FAX: (33) 4 38 78 50 58
Email: ALFAIDYBENHAROUGA@dsvsud.cea.fr

Key words: EG-VEGF. Angiogenesis. Placenta. Early pregnancy

Abstract

Angiogenesis is a key aspect of the dynamic changes occurring during placentation. Compelling evidence indicates that Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) is a key mediator of placental angiogenesis and seems to be deregulated in preeclampsia, the major cause of maternal morbidity and mortality. Recently, a new angiogenic factor, Endocrine Gland derived-VEGF (EG-VEGF) also known as prokineticin 1 (PK1) has been identified; its expression is restricted to endocrine glands, including placenta. In this study we investigated pattern of expression of EG-VEGF, of its related factor PK2, and of their receptors PKR1 and PKR2 in human placenta, during the first trimester pregnancy. We also examined EG-VEGF and PKR1 regulation by oxygen tension in isolated trophoblast cells (TC). Our results show that EG-VEGF, but not PK2, is expressed in the human placenta. EG-VEGF is mainly localized to the syncytiotrophoblast layer with the highest expression levels detected between the 8th and 10th week of gestation. EG-VEGF expression within placental villi is opposite to that of VEGF, which is mainly localized to the cytotrophoblast and extravillous-trophoblast. In TC, PKR1 mRNA is more abundant than PKR2 mRNA (up to 80 fold) and both EG-VEGF and PKR1 mRNAs are up-regulated by hypoxia. These findings suggest that EG-VEGF has a direct effect on TC via its receptor PKR1. The expression pattern of EG-VEGF, its regulation by oxygen tension and its complementary localization to VEGF suggest that this new factor is likely to play an important role in human placentation and might be deregulated in preeclampsia.

Introduction

During gestation, adequate and efficient supply of nutrients and gases is vital for proper development of the fetus. These fetomaternal exchanges rely on adequate vascularization of both the maternal decidua and the fetus-derived placental villi (Charnock-Jones, Kaufmann et al. 2004). In the human maternal decidua, vascular remodeling of the intramyometrial portion of the spiral arterioles occurs between the 10th and 12th week of gestation. This transformation is achieved by specialized placental cells, the cytotrophoblasts. During placentation, cytotrophoblasts that are present in anchoring villi generate multilayered columns of highly invasive extravillous trophoblasts (EVT) that colonize the interstitium of the maternal decidua, the inner third of the myometrium and the uterine blood vessels. This invasion results in the formation of the low resistance vascular system that is essential for fetal growth (Charnock-Jones, Kaufmann et al. 2004). This developmental period (10-12 weeks of gestation) is characterized by an important physiological switch in oxygen tension at the opening of the intervillous space. During early pregnancy, placentation occurs in relatively hypoxic conditions. Before the 9th week of gestation, placental oxygen tension is low (~20 mm Hg), and after 10 to 12 weeks of gestation, it increases to ~55 mm Hg (Jauniaux, Watson et al. 2000). At this time, the cytotrophoblasts turn from a proliferative to an invasive phenotype (Caniggia, Winter et al. 2000). Failure in this transition is associated with clinical complications of pregnancy such as preeclampsia, the most common cause of retarded fetal development (Sibai, Dekker et al. 2005).

Hemochorial placentation is also dependent on the establishment and maintenance of a competent fetoplacental vascular network formed by branching (first and second trimesters) and non-branching (third trimester) angiogenesis. In human placenta, branching angiogenesis is important for both the development of the villous vasculature and the formation of terminal villi. Consequently, careful coordination of development, proliferation, and differentiation of both trophoblasts and endothelial cells is required during the early stages of placental development. Angiogenic growth factors are considered to be the main mediators of these processes. Mouse models have demonstrated the importance of two families of ligands namely vascular endothelial growth factors (VEGFs) and angiopoietins and their tyrosine kinase receptors, in fetal and placental angiogenesis (Risau 1997; Yancopoulos, Klagsbrun et al. 1998; Neufeld, Cohen et al.

1999; Sibai, Dekker et al. 2005). The discrete phenotypes of the null animals suggest distinct roles for individual families, with VEGF family members being important for the initial stages of vasculogenesis and angiogenesis and angiopoietins being involved in the latter stages of fetal blood vessel maturation (Smith 2000). Besides its mitogenic action on endothelial cells, VEGF has also been reported to stimulate the proliferation of the choriocarcinoma cell line, BeWo (Charnock-Jones, Sharkey et al. 1994) and of extravillous trophoblast (Athanasopoulos and Lala 1998). Low VEGF levels or increased production of VEGF antagonists such as the soluble form of its receptor-1 (VEGF-R1/flt-1) have been proposed as possible mediators of preeclampsia (Ziche, Maglione et al. 1997; Zhou, McMaster et al. 2002; Taylor, Grimwood et al. 2003; Levine, Maynard et al. 2004). Although VEGF and angiopoietins are essentially selective for endothelial cells, they are widely expressed and are not specific for one type of tissue. The existence of organ-specific angiogenic factors has been postulated for many years (Palade, Simionescu et al. 1979; Stewart and Wiley 1981; Dellian, Witwer et al. 1996; Roberts, Delaat et al. 1998) but has only recently received confirmation when such a factor, named endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF) was characterized and sequenced (LeCouter, Kowalski et al. 2001). This new factor was found to be expressed in testis, adrenal gland, ovary and placenta (LeCouter, Kowalski et al. 2001). More interestingly, its angiogenic action appeared to be restricted to endothelial cells derived from endocrine tissues (LeCouter, Kowalski et al. 2001). In endothelial cells isolated from steroidogenic tissues, EG-VEGF was shown to promote proliferation, survival and chemotaxis (LeCouter, Kowalski et al. 2001; LeCouter, Lin et al. 2002). In vivo delivery of adenoviruses encoding EG-VEGF resulted in endocrine tissue-specific angiogenesis (LeCouter, Lin et al. 2003). EG-VEGF is a member of a class of proteins that also includes Bv8, a frog peptide purified from the skin secretion of the yellow-bellied toad *Bombina variegata* (LeCouter, Kowalski et al. 2001), also known as prokineticin-2 (PK2). Human EG-VEGF and Bv8 proteins present 83% identity, exert the same functions (21) and share the same G protein-coupled receptors, termed PKR1 and PKR2 (Lin, Bullock et al. 2002) .

EG-VEGF expression in the placenta was briefly described in the initial report by LeCouter et al (LeCouter, Kowalski et al. 2001). Since then, no further characterization of its cellular localization and its expression during pregnancy has been reported. The specificity of EG-VEGF expression in endocrine glands and its similarity of action with VEGF suggested to us that this new factor might be important in human placentation. The aims of this study were therefore to examine the expression of EG-VEGF, Bv8, PKR1 and PKR2 mRNAs in human placentas during the first trimester of pregnancy, determine their sites of expression within the chorionic villi and examine the effect of oxygen tension on their expression levels in isolated human trophoblast cells. Our results show that i) EG-VEGF mRNA and protein are much more abundantly expressed than Bv8 in human placenta ii) during the first trimester of pregnancy, EG-VEGF mRNA and protein expression peak between the 8th and 10th week of gestation iii) in isolated trophoblast cells, hypoxia up-regulates both EG-VEGF and PKR1 mRNA and iv) EG-VEGF and VEGF proteins show complementary localizations within chorionic villi during the first trimester of human pregnancy.

Materials and Methods

- **Tissue collection:**

First trimester human placentas from 4 to 12 weeks gestation (wg), corresponding to 6-14 weeks of amenorrhea were obtained from elective terminations of pregnancies. The sampling was as follows [4 wg (n = 3); 5 wg (n = 3); 6 wg (n = 3); 7wg (n = 3), 8 wg (n = 3), 9 wg (n = 3), 10wg (n = 3), 11wg (n = 3) and 12wg (n = 3)]. Shortly after collection, tissue was snap-frozen in dry ice and stored at -80°C (for RNA extraction), or fixed in paraformaldehyde at room temperature (for immunohistochemistry), or placed in ice-cold Hanks Balanced Salt Solution (Ca^{2+} -, Mg^{2+} - HBSS) and transported to the laboratory for *in vitro* primary culture. A total of 8 placentas from 7 to 10 wg were used for primary culture. Collection and processing of human placentas were approved by the local hospital ethical committees and clear consent was obtained from each patient. Mouse testis was also collected and used as positive control in this study.

Immunohistochemistry:

Placental tissues collected at 4-12 weeks of gestation were fixed for 24 h at 4°C in 4% (v/v) paraformaldehyde, embedded in paraffin, and cut into 5- μm sections. To control tissue integrity and select the most representative sections, every 10th section was stained with hematoxylin and eosin. Adjacent sections were stained using specific antibodies and the avidin-biotin immunoperoxidase detection method. Endogenous peroxidase activity was quenched by pretreatment with 3% (v/v) hydrogen peroxide in methanol for 30 min. Tissue sections were then washed in PBS and incubated with normal goat serum (10%) that served as a blocking agent for non-specific binding. Immunoreactive EG-VEGF or Bv8 were detected using rabbit polyclonal antibodies raised against the following peptides (human EG-VEGF peptide 84-96: LLCSRFPDGRYRC and a mixture of Bv8-derived peptides 26-40: DDAVITGACDKDSQC, and 94-108: CLRTSFNRFICLAQK). The immunization was performed by Covalab (Lyon, France). For immunohistochemical detection of these factors, tissues sections were incubated in the presence of

antibody dilutions for 18 h at 4°C, subsequently washed 3 times with PBS and incubated with biotinylated goat anti-rabbit IgG for 1 h at 4°C. After 3 PBS washes, the slides were incubated with an avidin-biotin complex (Vectastain ABC Kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA) for 1 h. After a final wash, the immunoreactive proteins were visualized after the addition of 3,3'-diaminobenzidine (DakoCytomation, Denmark) for 2 min. Control sections were treated with anti-EG-VEGF and anti-Bv8 antibodies that were preabsorbed with the appropriate antigen overnight at 4°C. The sensitivity of the EG-VEGF antibody was also tested by Western blotting using recombinant human EG-VEGF (rhEG-VEGF) (Tebu-Bio, France). The antibody was able to detect 10 ng/lane of rhEG-VEGF. This signal was completely abolished when EG-VEGF antibody was preabsorbed with the peptide antigen (data not shown).

Isolation and treatment of trophoblasts:

Placental cytotrophoblasts were isolated from first trimester human placentas (7-10 weeks of gestation, n=14) and cultured using a combination of two techniques described by Kliman et al. (Kliman, Nestler et al. 1986) and Tarrade et al (Tarrade, Lai Kuen et al. 2001). Briefly, tissue was thoroughly washed in 50 ml of cold sterile Ca²⁺-Mg²⁺-HBSS until the supernatant was nearly free of blood. Areas rich in chorionic villi were selected and were minced into small pieces between scalpels. Tissue was incubated in HBSS containing 0.125% trypsin (Sigma, France), 4.2 mM MgSO₄, 25 mM Hepes and 50,000 units/ml Dnase IV (Sigma, France) for 35 min at 37°C without agitation to remove extravillous trophoblast cells. After tissue sedimentation, the supernatant was discarded and the chorionic villi were submitted again to sequential 30 min trypsin (0.25%) and DNase (0.2 mg/ml, Sigma –Aldrich, St Louis, USA) digestions, as previously described (Kliman, Nestler et al. 1986; Alsat, Mirlesse et al. 1991). The dispersed placental cells were filtered through 200-µm nylon gauze and loaded onto a discontinuous Percoll Gradient (5-70% in 5% steps of 3 ml each), then centrifuged at 1200x g for 20 min at room temperature to separate the different cell types. Cytotrophoblast cells that sedimented between the density markers of 1.049 and 1.062 g/ml were collected and washed with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM). Isolated cells were then

incubated with anti-CD9 antibodies and subjected to negative immunomagnetic separation using MiniMacs columns (Miltenyi Biotec, Paris, France). This allows the elimination of CD9-positive placental mesenchymal cells, placental macrophages, and blood monocytes. Briefly, 10 μ l of anti-CD9 antibody (Biosource International, Camarillo, CA, USA) was added to 10^7 freshly isolated cells, and the mixture was incubated for 40 min on ice with gentle agitation. 20 μ l of goat anti-rat immunoglobulin G microbeads (Miltenyi Biotec, Gladbach, Germany) were mixed with the cell suspension, and mixture was kept at 4°C for 15 min under gentle rotation. The unabsorbed cell fraction containing trophoblasts was collected, washed three times and seeded at a density of 10^6 cells/ml in DMEM supplemented with 2mM glutamine, 10% FBS (fetal bovine serum), 25mM Hepes, 100 IU penicillin and 10 μ g/ml streptomycin, and plated at a density of 10^6 cells per ml. Approximately 4 to 5x 10^6 cells were obtained per gram of chorionic villi. The dispersed trophoblasts were cultured for 24 h at 37°C in 5% CO₂/ 95% air to allow attachment. The cells were then divided into two groups: half were incubated under standard tissue culture conditions (95% air- 5% CO₂) and half were incubated under hypoxic conditions (3% O₂ / 92% N₂ / 5% CO₂) for 24 h. Purity of the cell preparation was assessed at the end of the experiment by immunofluorescent staining for cytokeratin, an epithelial cell lineage marker (DakoCytomation, Denmark), or vimentin, a mesenchymal cell lineage marker (DakoCytomation, Denmark). After 48h of culture, a mixture of mononucleated cytotrophoblast and placental trophoblasts aggregates corresponding to a syncytial clumps is obtained. The cultured cells were 95 \pm 5% cytokeratin-positive and vimentin-negative, suggesting the presence of a majority of cytotrophoblasts and a minority of fibroblasts or decidual cells. Cell viability, assessed by Trypan blue exclusion, was >95% before and after incubation.

RNA isolation and Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction Analysis

Total RNA was extracted from total placental tissue and from isolated trophoblast after 48h in culture. The extraction was done in 4M guanidium isothiocyanate buffer using a rapid RNA isolation system (RNAgents; Promega, Charbonieres, France). Reverse transcription was performed on 1 μ g total RNA extracted from

placental tissue or from isolated trophoblast with Superscript II-RnaseH reverse transcriptase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) under conditions recommended by the manufacturer.

Real-Time Polymerase Chain Reaction analysis (PCR)

EG-VEGF, Bv8, PKR1, PKR2, VEGF mRNA, and 18S rRNA expression was quantified by real-time RT-PCR using a Light Cycler apparatus (Roche Diagnostics, Meylan, France). The PCR was performed using the primers shown in Table 1 and SYBR green PCR core reagents (Light cycler-FastStart Master SYBR Green I) according to the manufacturer's instructions. For non template negative control we used complete DNA amplification mix where the target cDNA template was replaced with water. PCR conditions were: step 1, 94°C for 10 min; step 2, 45 cycles consisting of 95°C for 15 sec, temperature indicated in Table 1 for 5 sec and 72°C for 10 sec. VEGF primers were designated to amplify the four human VEGF isoforms. The results were normalized to 18S rRNA expression levels. To assess linearity and efficiency of PCR amplification, standard curves for all transcripts were generated by using serial dilutions of cDNA. For standard curve generation we used cDNA, prepared by reverse transcription of RNA, isolated from human placenta (placental tissue) and from untreated "control" cells (trophoblast cells). A melt curve analysis was carried out on the products of amplification reaction to ascertain the melting temperature of the product. Single major peaks for all products were observed and the size of PCR product was assessed by agarose gel electrophoresis. The RealQuant analysis software was used to quantify levels of expression (Roche Diagnostics).

Semi-Quantitative Polymerase Chain Reaction

Semi-quantitative PCR was used on the set of experiment examining the effect of oxygen tension on EG-VEGF and PKR1 expression in isolated trophoblast cells. Before PCR, quantities of cDNA samples were adjusted to yield equal amplifications of mRNA encoding the internal reference control, ribosomal 18S. Specific oligonucleotide primers for EG-VEGF and PKR1 were designed using MacVector software (Table 1). According to the standardization, various amounts of

cDNAs were used for each PCR. PCRs were performed in a final volume of 25 µl containing 1x PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200mM deoxynucleotide triphosphate, 400 mM each primer, 0.5 U Taq polymerase (Q. Biogene, Montreal, Canada). The PCR conditions were: step 1, 94°C for 1 min; step 2, 25-35 cycles at hybridization temperature indicated in table 1; and step 3, 72°C for 5 min. To ensure semiquantitative results in the RT-PCR assays, the number of PCR cycles was selected to be in the linear range of amplification. PCR products were visualized after electrophoresis on 1.5 to 2 % gels by ethidium bromide staining.

Table 1. Primers used for semi-quantitative (SQ) and real-time (RT) PCR

| Gene | Forward primer | Reverse primer | T (°C) for RT | T (°C) for SQ |
|---------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| VEGF | 5'-CCGCAGACGTGTAAATGTTTCCT-3' | 5'-GGCTTGTCACATCTGCAAGTA-3' | 55 | |
| EG-VEGF | 5'-AGGTCCCCTTCTTCAGGAAACG-3' | 5'-TCCAGGCTGTGCTCAGGAAAAG-3' | 56 | 54 |
| Bv8 | 5'-TTTTCTCACCACCCCAAGCC-3' | 5'-CATTCCTTCTGTCCACACACCAG-3' | 57 | |
| PKR1 | 5'-GTCCTCGTCATTGTCAAGAGCC-3' | 5'-AAACACGGTGGGGAAGAAGTCG-3' | 58 | 58 |
| PKR2 | 5'-CATCCCATCGCCTTACTTTGC-3' | 5'-CTTTTCCTTCACGAACACAGTGG-3' | 60 | |
| 18S | 5'-TTGTTGGTTTTCGGAAGTGAAGC-3' | 5'-GGCAAATGCTTTCGCTCTGGTC-3' | 59 | 56 |

Statistical analysis

All data are expressed as mean ± SEM. Statistical comparisons were made using one-way ANOVA test and Student's t-test (p = 0.05). Calculations were performed using SigmaStat (Jandel Scientific Software, SanRafael, CA).

Results

EG-VEGF protein expression in human placenta during early pregnancy

Immunohistochemistry was used to define the pattern of expression of EG-VEGF and Bv8 proteins in human placenta during the first trimester of pregnancy, more precisely between 4 and 12 weeks of gestation. A total of 18 placentas were used (two different placental samples for each gestational age).

Immunoreactive EG-VEGF (Ir-EG-VEGF) was observed from 6 to 10 weeks of gestation. No staining was observed before 6 weeks or after 10 weeks of gestation. At 6 weeks of gestation, expression was limited to the syncytiotrophoblast layer (ST) of the chorionic villi (Fig.1A). The staining for EG-VEGF was more intense with advanced gestational ages in the syncytiotrophoblast layer (7-10 weeks) and became apparent in the inner cytotrophoblast (CT) layer. No staining was observed in the extravillous trophoblasts (EVT) forming the anchoring villi (Fig.1B). Ir-EG-VEGF was also found in fetal Hofbauer cells within the placental villous mesenchyme as early as 6 weeks of gestation. In contrast to Ir-EG-VEGF, Bv8 immunoreactivity was barely detectable in human placenta. There was a very weak or no staining for Ir-Bv8 protein in placental tissue from 4 to 12 weeks of gestation. A very faint staining was observed in the ST layer between 6 and 10 weeks. As our antibody was designed to react with both human and mouse Bv8 protein, we used mouse testis as a positive control for Bv8 immunoreactivity. As expected, Bv8 immunoreactivity was detectable in primary spermatocytes. Ir-Bv8 was also observed in Leydig cells (Fig. 1F). Preadsorption of the anti-EG-VEGF and anti-Bv8 antibodies with an excess of immunizing peptide completely eliminated staining from chorionic villi (insets in Fig 1B, 1F) and mouse testis (Fig. 1E), respectively), thus confirming the specificity of the observed immunolocalizations.

-
-
- **Differential localization of EG-VEGF and VEGF proteins in human chorionic villi during the first trimester of pregnancy.**
- As both VEGF and EG-VEGF are expressed in human placenta during the first trimester of pregnancy, we sought to compare their cellular localization within chorionic villi at different gestational ages. Using immunohistochemistry, we compared EG-VEGF and VEGF protein expression in placentas from 6 to 12 weeks of gestation (Fig.2). VEGF expression was restricted to the cytotrophoblast layer in the chorionic villi (Fig. 2A). In anchoring villi, VEGF expression was also observed in extravillous trophoblasts (Fig. 2B). In contrast to VEGF, EG-VEGF was mainly localized in the syncytiotrophoblast

layer (Fig. 2D). Its expression was also found in the cytotrophoblast at advanced gestational ages (Fig. 2E, 2F). However, no expression of EG-VEGF was ever observed in extravillous trophoblasts at all gestational ages examined (Fig. 2E). Such a differential pattern of expression for VEGF and EG-VEGF suggests possible complementary functions for the two factors in human placenta during the first trimester of pregnancy.

-
- **EG-VEGF, Bv8, PKR1, PKR2 and VEGF mRNA expression during the first trimester of human pregnancy.**

Human placenta, like other endocrine tissues, has been reported to be an important site of EG-VEGF expression (LeCouter, Kowalski et al. 2001). However, to date no study has examined the pattern of its expression during the first trimester of pregnancy when the angiogenic process is the most active. This prompted us to examine the expression pattern of EG-VEGF, Bv8 and their common receptors PKR1 and PKR2 mRNAs in human placentas from 4 to 12 weeks of gestation, using real time RT-PCR. EG-VEGF mRNA was detected at all gestational ages examined (n=27) but its levels were strongly increased (up to 6-7 fold) between the 8th and 10th week of gestation, as compared with gestational ages before and after this period ($P<0.001$) (Fig. 3A). In contrast, Bv8 mRNA expression was undetectable except between the 8th and 10th weeks of gestation (data not shown). PKR1 and PKR2 were also expressed during the first trimester of pregnancy. PKR1 exhibited the same pattern of expression as EG-VEGF with levels peaking between 8 and 10 weeks of gestation (Fig. 3C). In contrast, PKR2 mRNA levels did not vary much until the end of the first trimester (12 weeks) when it increased 3 fold (Fig. 3D).

As VEGF is considered as the most important factor controlling human placental angiogenesis during the first trimester of pregnancy (Torry, Hinrichs et al. 2004), we sought to examine its pattern of expression on the same samples. VEGF mRNA expression did not significantly change during the first trimester. A slight increase was, however, observed by the end of the examined period. These results indicate that placental EG-VEGF and VEGF exhibit quite different patterns of expression during early pregnancy (Fig. 3B).

- **Expression of EG-VEGF, Bv8, PKR1 and PKR2 in human placental tissue and cultured trophoblast cells during the first trimester of pregnancy.**

- To further evaluate the relative expression of EG-VEGF and Bv8 in human placenta, we used real-time RT-PCR to compare their mRNA levels in placental tissues (n=12) from 7 to 10 weeks of gestation, a period of gestation when both factors seem to be expressed. A similar analysis was performed on primary cultures of trophoblast cells (n=8) isolated from placentas with the same gestational age and cultured for 48 h. In both placental tissue (Fig. 4A) and primary trophoblast cultures, EG-VEGF mRNA was 5 times more abundant than Bv8 mRNA (Fig. 4B), thereby confirming the differences observed between the two factors at their protein levels.

- We then compared the mRNA expression levels of the EG-VEGF/Bv8 receptors PKR1 and PKR2 in both placental tissue (n=12) and in primary trophoblast culture (n=8). Our results show that PKR1 and PKR2 transcripts are expressed at the same level in whole placental tissue (Fig. 4C) whereas PKR1 mRNAs were 80 times more abundant than PKR2 mRNAs in cultured trophoblast cells (Fig. 4D). These data strongly suggest that, within human placenta, there is a cellular specificity for PKR1 and PKR2 expression.

-

- **Effect of oxygen tension on EG-VEGF and PKR1 mRNA expression in human trophoblast cells.**

Low oxygen tension is a key parameter that controls specific gene expression during the first trimester of pregnancy. Moreover, the highest levels of expression of EG-VEGF and of its receptor PKR1 are observed during the hypoxic period of human placentation. This observation prompted us to hypothesize that EG-VEGF and PKR1 mRNA might be regulated by oxygen tension in human trophoblast cells. To test this hypothesis we incubated trophoblast cells isolated from 7 to 10 week placentas for 24h under either 20% O₂ or 3% O₂. Both semi-quantitative and quantitative PCR were used in this set of experiment. The same

results were obtained using both techniques. Figure 5 shows data obtained using semi-quantitative PCR analysis of EG-VEGF and PKR1 expression. There was a significant increase in both EG-VEGF (160% of normoxic control) and PKR1 (200% of normoxic control) mRNA levels under hypoxic conditions (3% O₂). Figure 5A shows a representative blot of three independent experiments. The graphs on Fig 5B and 5C summarize the results obtained in six independent experiments for EG-VEGF and PKR1 respectively.

-

Discussion

The present study demonstrates expression of EG-VEGF and its G protein-coupled receptors PKR1 and PKR2 in the human placenta during the first trimester of pregnancy and show that EG-VEGF and VEGF have distinct spatio-temporal patterns of expression. Furthermore, we report that the expression of EG-VEGF and PKR1 peaks at a specific time during the first trimester of pregnancy (8 to 10 weeks of gestation), corresponding to the hypoxic period of placental development that precedes the establishment of the feto-maternal vascular connection. In isolated trophoblast cells we have also demonstrated that both EG-VEGF and PKR1 are up-regulated by hypoxia. Taken together, the data generated by this work reveal that the new factor EG-VEGF and its receptor PKR1 may play an important role in human placentation during the hypoxic period of placental development.

To date, four studies have reported a constitutive expression of EG-VEGF in human placentas from term pregnancies (LeCouter, Kowalski et al. 2001; Li, Bullock et al. 2001; LeCouter, Lin et al. 2003; Chung, Song et al. 2004) and two of them have shown an expression of Bv8 in the same tissue (Li, Bullock et al. 2001; LeCouter, Lin et al. 2003). In the present study, we examined the expression of both factors in human placentas during the first trimester of pregnancy when angiogenesis is active. Our data show that EG-VEGF is expressed at all gestational ages examined, whereas Bv8 is only barely detectable between the 8th and 10th weeks of gestation. Moreover, EG-VEGF mRNA levels are 5 times higher than Bv8 mRNA levels. This differential pattern of expression is similar to that observed in the human endometrium (Battersby, Critchley et al. 2004) and human corpus luteum (Fraser, Bell et al. 2005).

The immunolocalization experiments performed in this study have revealed interesting patterns of distribution. The results substantiate the conclusions of the RT-PCR experiments and show that Ir-EG-VEGF is present in the syncytiotrophoblasts. The strong expression of EG-VEGF in the syncytiotrophoblast suggests that this factor is probably synthesized by this endocrine component of the placenta and that its expression is associated with the degree of trophoblast differentiation.

Given the established importance of VEGF in human placentation (Wulff, Wilson et al. 2002; Wulff, Weigand et al. 2003), and the partial similarity of its biological functions with those of EG-VEGF, we compared their pattern of expression during the first trimester of pregnancy. Interestingly, we observed that these factors were expressed in adjacent but distinct compartments. In contrast to EG-VEGF which was localized to the syncytiotrophoblast layer, VEGF was mainly present in the cytotrophoblasts and extravillous trophoblasts. This finding is reminiscent of the localizations of the same factors in human ovaries, where VEGF and EG-VEGF were rarely colocalized in the same cell type during follicular and luteal phases (Ferrara, Frantz et al. 2003). Based on its specific pattern of expression and its absence of colocalization with VEGF, EG-VEGF appears to be a novel growth factor likely to play complementary biological roles to those of VEGF.

EG-VEGF/PK1 and Bv8/PK2 are equally potent ligands for two structurally related G protein-coupled receptors named PKR1 and PKR2 (Lin, Bullock et al. 2002; Lin, LeCouter et al. 2002; Masuda, Takatsu et al. 2002; Soga, Matsumoto et al. 2002). These two receptors are expressed in gastrointestinal organs, endocrine glands, central nervous system and many other tissues, suggesting a wide range of biological actions for EG-VEGF and Bv8 (Lin, Bullock et al. 2002; Soga, Matsumoto et al. 2002). Different patterns of PKR1 and PKR2 expression have been observed in different cell types. For example, endothelial cells of the bovine corpus luteum appear to express both PKR1 and PKR2 (Fraser, Bell et al. 2005) whereas endocrine granulosa and thecal cells preferentially express PKR1 (Kisliouk, Levy et al. 2003). In first trimester human placentas, our data show that PKR1 and PKR2 are expressed at the same levels, whereas in primary trophoblast culture, only PKR1 appeared to be expressed. These findings clearly suggest that PKR1 and PKR2 may have different cellular localizations within the placental villi. We propose that PKR2 is likely to be localized in endothelial cells of fetal blood vessels since in other tissues this receptor has been reported to be specifically localized to endothelial cells (Kisliouk, Levy et al. 2003; LeCouter and Ferrara 2003; LeCouter, Lin et al. 2003). The data presented herein are clear about PKR1 expression in trophoblast cells. However, it is difficult to know which type of trophoblast cell expresses PKR1 since our

cytotrophoblast cell preparations are slightly contaminated by the syncytial fraction. Because of the lack of commercially available antibodies to PKR1 and PKR2, we cannot make any firm conclusions regarding the sites of expression of these receptors within the placental villi. Nevertheless, the expression of PKR1 in trophoblast cells suggests a direct effect of EG-VEGF on non-endothelial cells. This finding has to be integrated with the potential role that EG-VEGF may have in the human placentation processes. Therefore, the previously characterized endocrine tissue-specific angiogenic actions may very well be one among many other functions played by this factor in endocrine tissues.

EG-VEGF levels appeared to greatly vary during early pregnancy; they progressively increase until the 10th week of gestation and rapidly drop afterwards. These dramatic changes appear to be correlated with the hypoxic developmental period of the placenta, since the junction of the fetal and maternal vascular networks is known to occur between the 10th and 12th week of gestation. This correlation is supported by our observation of an up-regulation of EG-VEGF expression in primary cultures of human trophoblasts following 24h of culture under reduced O₂ tension (3% O₂). This regulation was not unexpected as a functional hypoxia-response element (TACGTGCGGC) able to bind the hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 α) has been identified in the human EG-VEGF promoter (LeCouter, Kowalski et al. 2001). However, we cannot totally exclude that other factors presenting peaks in their expression during the first trimester of pregnancy may also participate in the regulation of EG-VEGF expression. Human choriogonadotropin (hCG) and progesterone are two such candidates as they have been recently shown to stimulate EG-VEGF mRNA expression in human luteinized granulosa cells (Fraser, Bell et al. 2005) and human endometrial tissue (Battersby, Critchley et al. 2004), respectively.

Regulation of placental growth factors by oxygen tension is well established and has been described for other angiogenic factors, including VEGF (Kingdom and Kaufmann 1999; Ahmed, Dunk et al. 2000), TGF β 3 (Schaffer, Scheid et al. 2003) and the soluble form of VEGF receptor-1 (s-flt) (Nagamatsu, Fujii et al. 2004; Li, Gu et al. 2005). In this study, we also observed up-regulation of PKR1 receptor expression under hypoxic conditions. This is the first report indicating PKR1 regulation by oxygen tension. A

GenBank screen of the human PKR1 promoter revealed the presence of one putative HIF-1 binding site, suggesting that the oxygen effect on PKR1 expression might occur through a pathway that involves HIF-1. This finding further supports the idea that the complex EG-VEGF/PKR1 may play an important role in normal human placentation and perhaps in pathologies such as preeclampsia. A recent study by Chung et al reported no change in EG-VEGF expression in placentas from preeclamptic patients (Chung, Song et al. 2004). In this study, EG-VEGF expression has been examined during the second and third trimester of pregnancy. However, it is well documented that the origin of preeclampsia takes place during the first trimester of pregnancy and that changes in protein expression after the establishment of the disease are considered to be consequences of the disease rather than causes of its development. Our data show that EG-VEGF expression is at its lowest levels by the end of the first trimester suggesting that its greatest role should occur within that trimester. Moreover, given the correlation between the pattern of EG-VEGF and PKR1 expression with the hypoxic period of placental development and knowing that failure in placental angiogenesis is thought to contribute to preeclampsia development, one can speculate on the potential implication of this factor and/or its receptors in the development of this pathology. Only a prospective study examining the expression of EG-VEGF and /or PKR1 during the first trimester of pregnancy in women who will potentially develop preeclampsia could answer this question. Future studies should determine the biological activities triggered by EG-VEGF in the human placenta and identify whether deregulations of EG-VEGF expression are associated with placental pathologies.

Figure 1

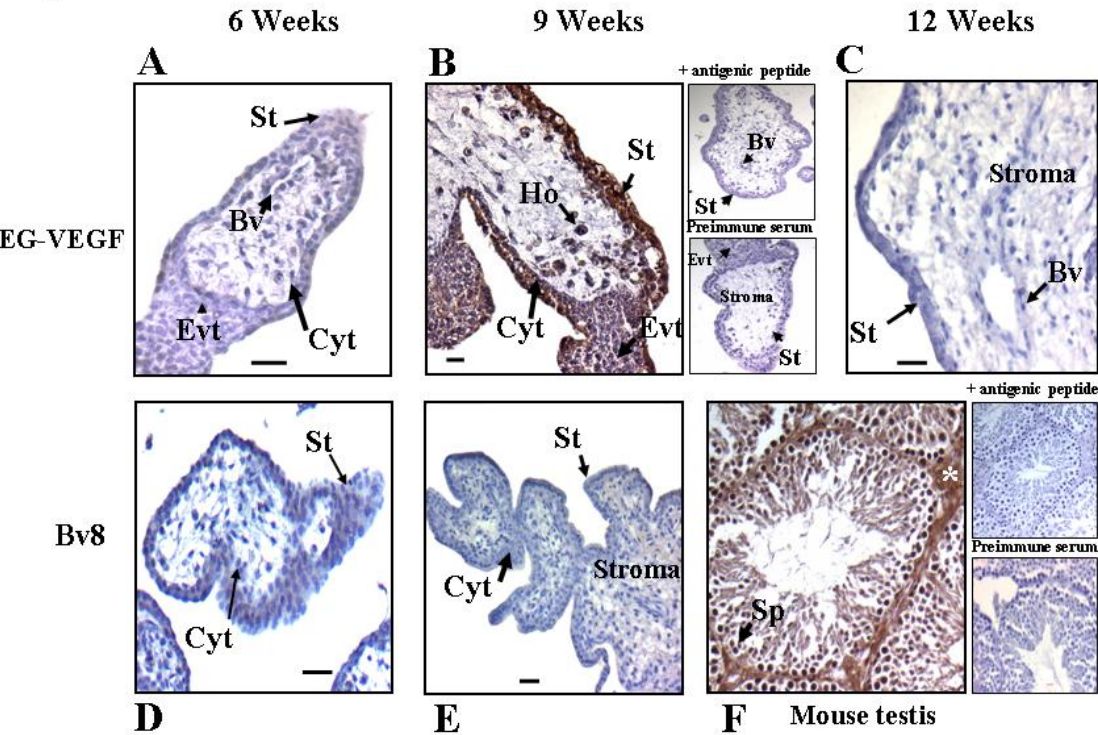


Figure 2

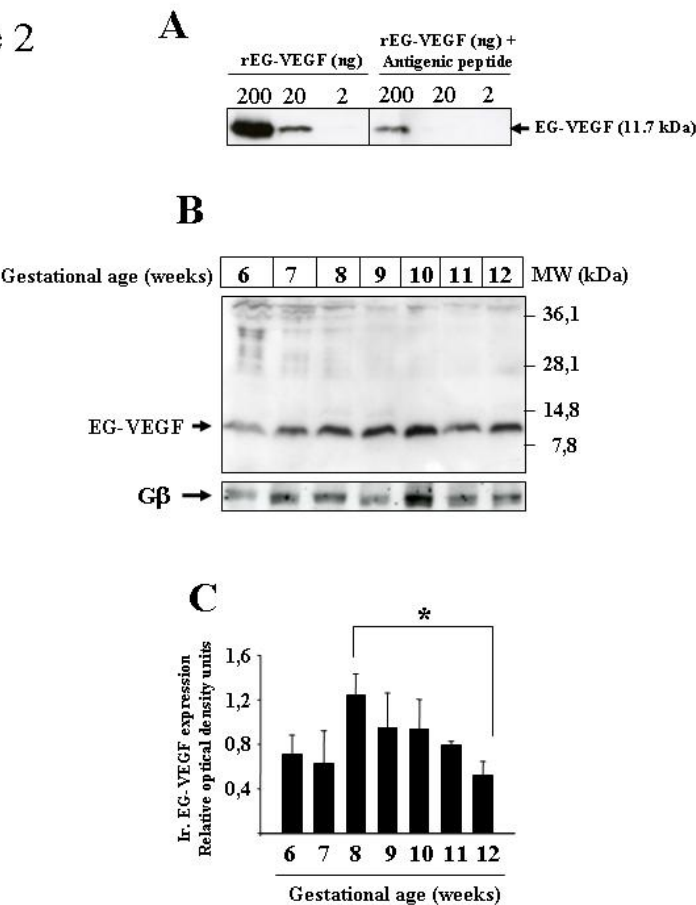


Figure 3

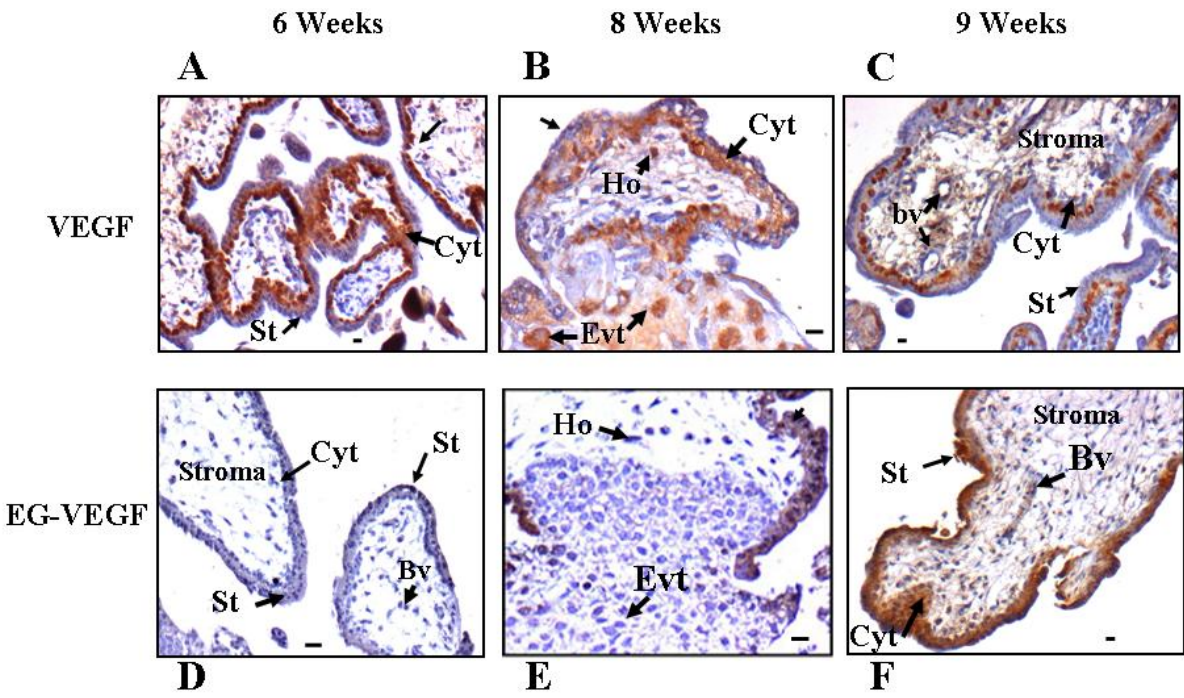


Figure 4

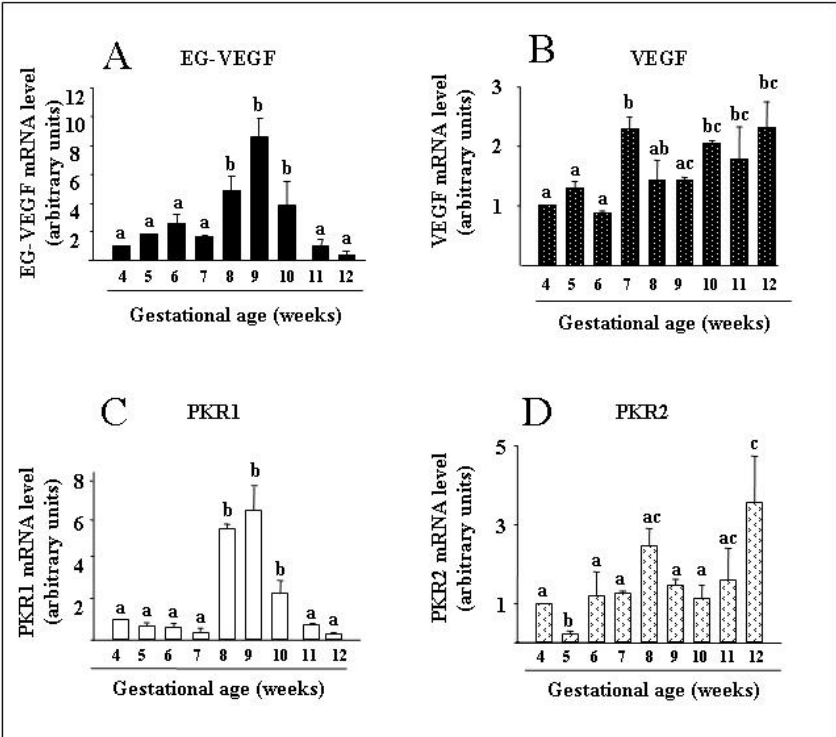


Figure 5

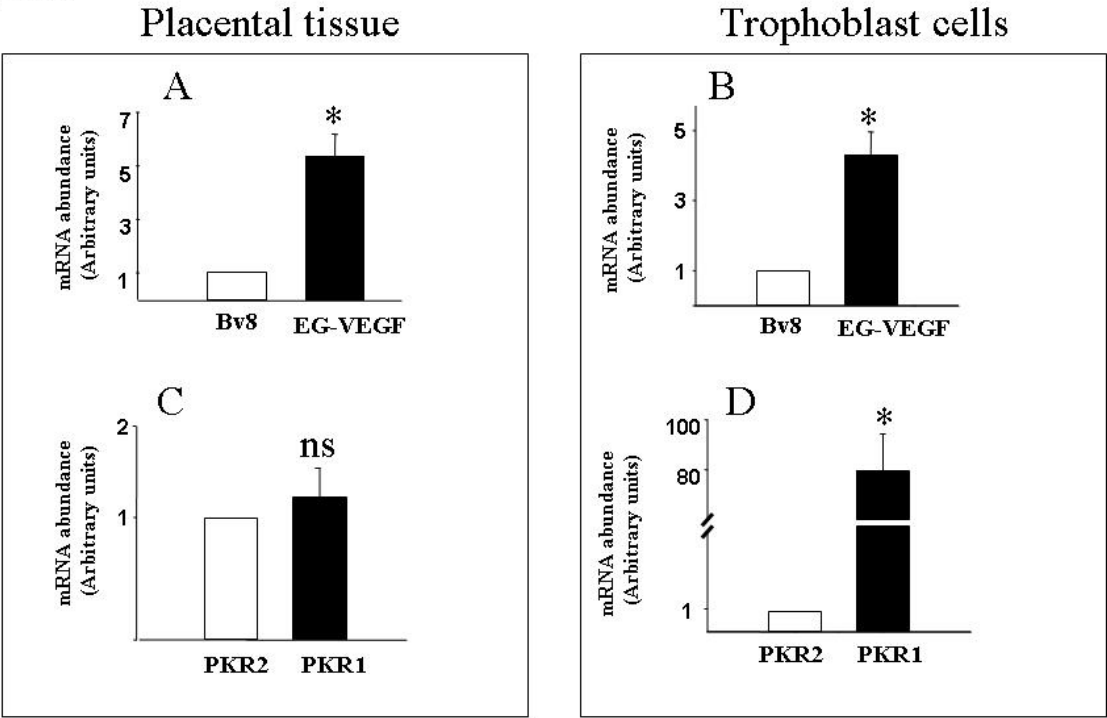


Figure 6

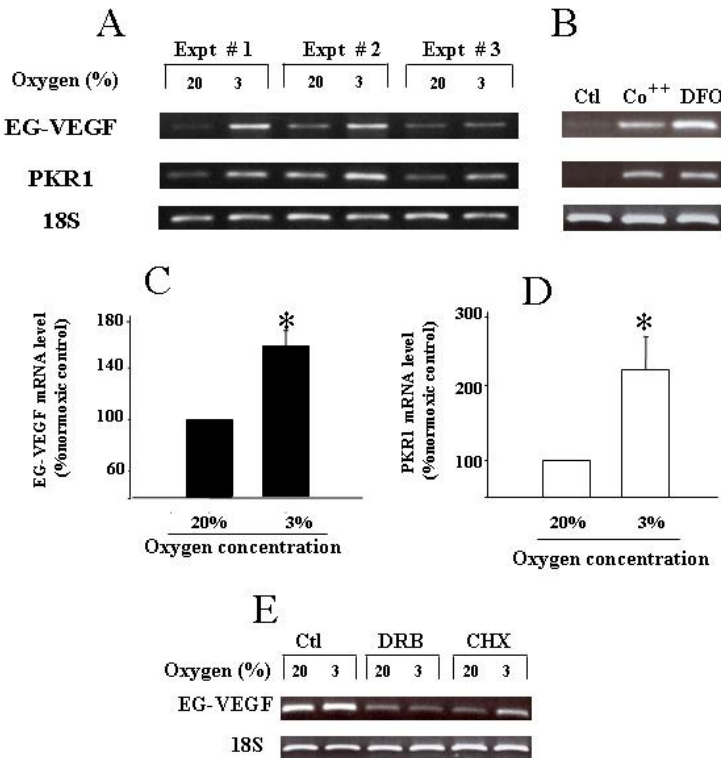


Figure legends

Figure 1. EG-VEGF and Bv8 immunolocalization in human placental villous tissue during early pregnancy. A total of 18 placentas, from 4 to 12 weeks of gestation, were used (two different samples for each gestational age). **1A**, **1B** and **1C** represent chorionic villi at 6, 9 and 12 weeks gestation stained with anti-EG-VEGF antibody. **1D** and **1E** represent chorionic villi at 6, 9 weeks of gestation stained with anti-Bv8 antibody. **1F** represents a positive control for Bv8 staining in mouse testis. Insets in **1B**, and **1F** represent negative controls treated with EG-VEGF and Bv8 antibodies that have been preabsorbed overnight at 4⁰C with the appropriate immunogen. Note that EG-VEGF immunoreactivity was stronger at 9 weeks as compared to 6 and 12 weeks of gestation. A very low immunoreactivity of Bv8 was observed at 9 weeks of gestation, but no staining was obtained at all other gestational ages tested. Cytotrophoblast (Ct), Hofbauer cells (Ho), Extravillous trophoblast (EVT) syncytiotrophoblast (St). Scale bar = 20 μ m

Figure 2: Comparison of VEGF and EG-VEGF immunolocalization in placental villous tissues. A total of 18 placentas, from 4 to 12 weeks of gestation, were used (two different placental samples for each gestational age). **2A**, **2B** and **2C** show representative VEGF immunoreactivity at 6, 8 and 12 weeks of gestation, respectively. **2D**, **2E** and **2F** show EG-VEGF immunoreactivity at the same gestational ages. Note that VEGF and EG-VEGF exhibit complementary sites of immunoreactivity in chorionic villi and that extravillous trophoblasts express VEGF but not EG-VEGF. Cytotrophoblast (Ct), Hofbauer cells (Ho), Extravillous trophoblast (EVT), syncytiotrophoblast (St). Scale bar= 20 μ m

Figure 3: Patterns of placental EG-VEGF (**A**), VEGF (**B**), PKR1 (**C**) and PKR2 mRNA (**D**) expression during the first trimester of pregnancy. The expression levels of the selected mRNAs were quantified by quantitative RT-PCR and normalized to the 18S rRNA levels as described in Materials and Methods. The relative levels of each gene were plotted as function of gestational age. A total of 27 placentas (three

different placental samples for each gestational age examined) from 4 to 12 wg were used. Data are expressed as mean \pm SE.; each bar is the mean of 3 determinations from 3 independent placentas of the same gestational age. Bars labeled with different letters represent values that are significantly different from each other ($P < 0.05$).

Figure 4: Comparison of EG-VEGF/ Bv8 and PKR1/PKR2 mRNA expression in human placental tissue and in primary trophoblast cells isolated. Placentas (n=20) were collected between 7 and 10 weeks of gestation. Amplification of 18S mRNA was used as internal standard for samples normalization. **(4A)** and **(4C)** show EG-VEGF mRNA levels normalized to Bv8 and PKR1 mRNA levels normalized to PKR2 in placental tissue respectively. **(4B)** and **(4D)** show EG-VEGF mRNA levels normalized to Bv8 and PKR1 mRNA levels normalized to PKR2 in primary isolated trophoblast respectively. Data are mean \pm S.E. * $P < 0.05$. ns= not statistically significant.

Figure 5 Effect of hypoxia on EG-VEGF and PKR1 mRNA expression in human trophoblast cells. Cytothoblasts were isolated from six different placentas collected at 7-10 weeks of gestation and cultured for 24h to allow attachment and for another 24h under either 20% O₂ or 3% O₂. By 48h, the culture contains both mononucleated trophoblast cells and syncytial clumps. The upper panel shows EG-VEGF and PKR1 mRNA expression under 20% or 3% O₂ in three independent experiments. Variations (in % of control) of EGVEGF/18S or PKR1/18S mRNA ratios after 24h incubation are shown on **(Fig 5A)** and **(Fig 5B)** respectively. The 20% O₂ condition was used as a control and normalized to 100%. * $P < 0.001$.

References

1. **Charnock-Jones DS, Kaufmann P, Mayhew TM** 2004 Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. *Placenta* 25:103-13

2. **Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao YP, Skepper JN, Burton GJ** 2000 Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol* 157:2111-22
3. **Caniggia I, Winter J, Lye SJ, Post M** 2000 Oxygen and placental development during the first trimester: implications for the pathophysiology of pre-eclampsia. *Placenta* 21 Suppl A:S25-30
4. **Sibai B, Dekker G, Kupferminc M** 2005 Pre-eclampsia. *Lancet* 365:785-99
5. **Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z** 1999 Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J* 13:9-22
6. **Risau W** 1997 Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386:671-4
7. **Yancopoulos GD, Klagsbrun M, Folkman J** 1998 Vasculogenesis, angiogenesis, and growth factors: ephrins enter the fray at the border. *Cell* 93:661-4
8. **Smith SK** 2000 Angiogenesis and implantation. *Hum Reprod* 15 Suppl 6:59-66
9. **Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Boock CA, Ahmed A, Plevin R, Ferrara N, Smith SK** 1994 Vascular endothelial growth factor receptor localization and activation in human trophoblast and choriocarcinoma cells. *Biol Reprod* 51:524-30
10. **Athanassiades A, Lala PK** 1998 Role of placenta growth factor (PIGF) in human extravillous trophoblast proliferation, migration and invasiveness. *Placenta* 19:465-73
11. **Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA** 2004 Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med* 350:672-83
12. **Taylor RN, Grimwood J, Taylor RS, McMaster MT, Fisher SJ, North RA** 2003 Longitudinal serum concentrations of placental growth factor: evidence for abnormal placental angiogenesis in pathologic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 188:177-82
13. **Zhou Y, McMaster M, Woo K, Janatpour M, Perry J, Karpanen T, Alitalo K, Damsky C, Fisher SJ** 2002 Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *Am J Pathol* 160:1405-23
14. **Ziche M, Maglione D, Ribatti D, Morbidelli L, Lago CT, Battisti M, Paoletti I, Barra A, Tucci M, Parise G, Vincenti V, Granger HJ, Viglietto G, Persico MG** 1997 Placenta growth factor-1 is chemotactic, mitogenic, and angiogenic. *Lab Invest* 76:517-31
15. **Dellian M, Witwer BP, Salehi HA, Yuan F, Jain RK** 1996 Quantitation and physiological characterization of angiogenic vessels in mice: effect of basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor, and host microenvironment. *Am J Pathol* 149:59-71
16. **Palade GE, Simionescu M, Simionescu N** 1979 Structural aspects of the permeability of the microvascular endothelium. *Acta Physiol Scand Suppl* 463:11-32
17. **Roberts WG, Delaat J, Nagane M, Huang S, Cavenee WK, Palade GE** 1998 Host microvasculature influence on tumor vascular morphology and endothelial gene expression. *Am J Pathol* 153:1239-48
18. **Stewart PA, Wiley MJ** 1981 Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: a study using quail--chick transplantation chimeras. *Dev Biol* 84:183-92
19. **LeCouter J, Kowalski J, Foster J, Hass P, Zhang Z, Dillard-Telm L, Frantz G, Rangell L, DeGuzman L, Keller GA, Peale F, Gurney A, Hillan KJ, Ferrara N** 2001 Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium. *Nature* 412:877-84
20. **LeCouter J, Lin R, Ferrara N** 2002 Endocrine gland-derived VEGF and the emerging hypothesis of organ-specific regulation of angiogenesis. *Nat Med* 8:913-7
21. **LeCouter J, Lin R, Tejada M, Frantz G, Peale F, Hillan KJ, Ferrara N** 2003 The endocrine-gland-derived VEGF homologue Bv8 promotes angiogenesis in the testis: Localization of Bv8 receptors to endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2685-90

22. **Lin DC, Bullock CM, Ehlert FJ, Chen JL, Tian H, Zhou QY** 2002 Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 277:19276-80
23. **Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM, Strauss JF, 3rd** 1986 Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology* 118:1567-82
24. **Tarrade A, Lai Kuen R, Malassine A, Tricottet V, Blain P, Vidaud M, Evain-Brion D** 2001 Characterization of human villous and extravillous trophoblasts isolated from first trimester placenta. *Lab Invest* 81:1199-211
25. **Alsat E, Mirlesse V, Fondacci C, Dodeur M, Evain-Brion D** 1991 Parathyroid hormone increases epidermal growth factor receptors in cultured human trophoblastic cells from early and term placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 73:288-95
26. **Torry DS, Hinrichs M, Torry RJ** 2004 Determinants of placental vascularity. *Am J Reprod Immunol* 51:257-68
27. **Kaser A, Winklmayr M, Lepperdinger G, Kreil G** 2003 The AVIT protein family. Secreted cysteine-rich vertebrate proteins with diverse functions. *EMBO Rep* 4:469-73
28. **Chung JY, Song Y, Wang Y, Magness RR, Zheng J** 2004 Differential expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), endocrine gland derived-VEGF, and VEGF receptors in human placentas from normal and preeclamptic pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2484-90
29. **Battersby S, Critchley HO, Morgan K, Millar RP, Jabbour HN** 2004 Expression and regulation of the prokineticins (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and Bv8) and their receptors in the human endometrium across the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2463-9
30. **Fraser HM, Bell J, Wilson H, Taylor PD, Morgan K, Anderson RA, Duncan WC** 2005 Localization and quantification of cyclic changes in the expression of endocrine gland vascular endothelial growth factor in the human corpus luteum. *J Clin Endocrinol Metab* 90:427-34
31. **Wulff C, Weigand M, Kreienberg R, Fraser HM** 2003 Angiogenesis during primate placentation in health and disease. *Reproduction* 126:569-77
32. **Wulff C, Wilson H, Dickson SE, Wiegand SJ, Fraser HM** 2002 Hemochorial placentation in the primate: expression of vascular endothelial growth factor, angiopoietins, and their receptors throughout pregnancy. *Biol Reprod* 66:802-12
33. **Lin R, LeCouter J, Kowalski J, Ferrara N** 2002 Characterization of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor signaling in adrenal cortex capillary endothelial cells. *J Biol Chem* 277:8724-9
34. **Masuda Y, Takatsu Y, Terao Y, Kumano S, Ishibashi Y, Suenaga M, Abe M, Fukusumi S, Watanabe T, Shintani Y, Yamada T, Hinuma S, Inatomi N, Ohtaki T, Onda H, Fujino M** 2002 Isolation and identification of EG-VEGF/prokineticins as cognate ligands for two orphan G-protein-coupled receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 293:396-402
35. **Soga T, Matsumoto S, Oda T, Saito T, Hiyama H, Takasaki J, Kamohara M, Ohishi T, Matsushime H, Furuichi K** 2002 Molecular cloning and characterization of prokineticin receptors. *Biochim Biophys Acta* 1579:173-9
36. **Kisliouk T, Levy N, Hurwitz A, Meidan R** 2003 Presence and regulation of endocrine gland vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 and its receptors in ovarian cells. *J Clin Endocrinol Metab* 88:3700-7
37. **Ahmed A, Dunk C, Ahmad S, Khaliq A** 2000 Regulation of placental vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PlGF) and soluble Flt-1 by oxygen--a review. *Placenta* 21 Suppl A:S16-24
38. **Kingdom JC, Kaufmann P** 1999 Oxygen and placental vascular development. *Adv Exp Med Biol* 474:259-75

39. **Schaffer L, Scheid A, Spielmann P, Breymann C, Zimmermann R, Meuli M, Gassmann M, Marti HH, Wenger RH** 2003 Oxygen-regulated expression of TGF-beta 3, a growth factor involved in trophoblast differentiation. *Placenta* 24:941-50
40. **Li H, Gu B, Zhang Y, Lewis DF, Wang Y** 2005 Hypoxia-induced increase in soluble Flt-1 production correlates with enhanced oxidative stress in trophoblast cells from the human placenta. *Placenta* 26:210-7
41. **Nagamatsu T, Fujii T, Kusumi M, Zou L, Yamashita T, Osuga Y, Momoeda M, Kozuma S, Taketani Y** 2004 Cytotrophoblasts up-regulate soluble fms-like tyrosine kinase-1 expression under reduced oxygen: an implication for the placental vascular development and the pathophysiology of preeclampsia. *Endocrinology* 145:4838-45

Discussion

Dans cet article, nous nous sommes intéressés principalement à décrire les variations d'expression du EG-VEGF et de la cytokine apparentée Bv8 humaine, et de leurs récepteurs PKR-1 et PKR-2 dans des extraits de placentas totaux pendant le premier trimestre de la grossesse, ainsi que leur localisation. Nous avons constaté que le EG-VEGF était principalement présent dans les syncytiotrophoblastes, ce qui était cohérent puisqu'ils constituent l'unité endocrine du placenta. Par contre, nous avons eu la surprise de constater que le récepteur PKR-1 était lui aussi présent dans les trophoblastes (en culture), et ce de façon 80 fois plus abondante que le PKR2. Nous n'avons pas pu isoler de cellules microvasculaires villositaires pour chercher si elles aussi présentaient des récepteurs d'EG-VEGF. Mais ces résultats nous ont amenés à penser que EG-VEGF pourrait avoir une action auto- et paracrine sur les trophoblastes villositaires et donc jouer un rôle important sur le développement placentaire. Nous avons, après la publication de cet article, obtenu des anticorps anti-PKR-1 et -2 et avons ainsi pu avancer dans cette hypothèse. En effet, nous avons constaté que le PKR-1 était principalement présent dans les cytotrophoblastes, à l'exception des cytotrophoblastes extravilleux, alors que PKR-2 est principalement présent dans les trophoblastes extravilleux (figure 34), avec une expression persistant à 12 SA (non montré). Ceci nous a permis d'émettre l'hypothèse que le PKR-1 pourrait médier les effets de EG-VEGF sur les trophoblastes villositaires, et que PKR-2 pourrait être impliqué dans la régulation de l'invasion extravillositaire. Quoi qu'il en soit, ceci laissait penser que les deux récepteurs pourraient avoir des rôles différents dans le développement du placenta, et autres qu'angiogènes. Ces résultats complémentaires nous confortent dans l'idée que PKR-1 médierait une action sur les trophoblastes villositaires, alors que PKR-2 médierait peut-être un rôle plus angiogène sur les vaisseaux fœtaux et les trophoblastes extravilleux. Ceci est en contradiction avec les résultats publiés par Lin (Lin, LeCouter et al. 2002) qui montrait que l'activation de PKR-1 par EG-VEGF activait préférentiellement la phosphorylation de Akt, souvent impliquée dans l'angiogenèse. Mais

c'est en accord avec les résultats de Kisliouk et al qui montraient une présence de PKR-1 majoritairement dans les cellules stéroïdogènes ovariennes, laissant présager d'un rôle dans la stéroïdogénèse (Kisliouk, Podlovni et al. 2005).

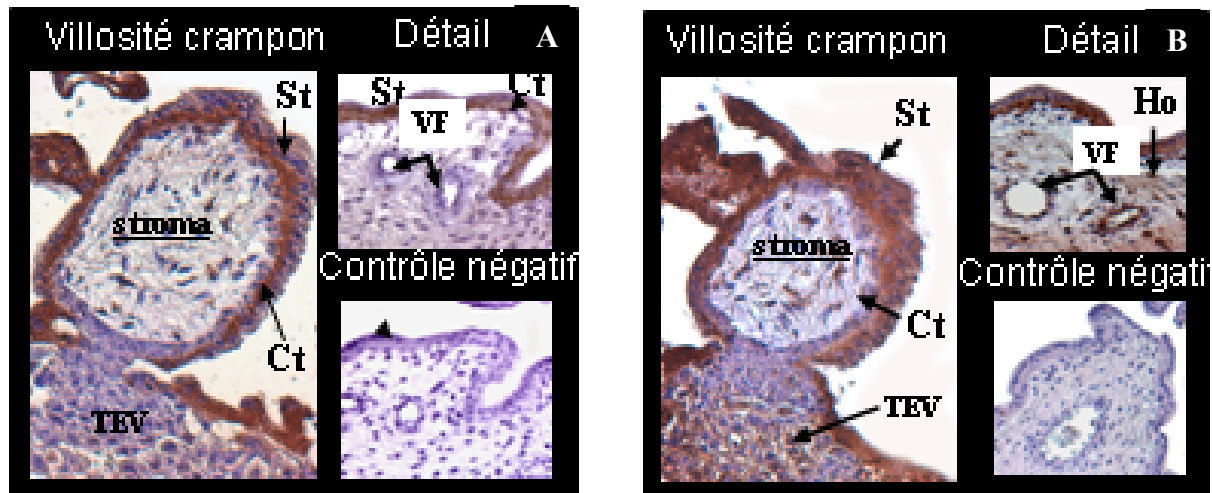


Figure 34 : immunohistochimie de PKR-1 (A) et PKR-2 (B) dans des villosités placentaires à 11 SA.

Les localisations de l'un et l'autre des récepteurs sont différentes, PKR-1 se trouvant principalement exprimé dans les cytotrophoblastes (Ct), alors que PKR-2 est retrouvé dans les cellules endothéliales des vaisseaux fœtaux villositaires (VF), les cellules de Hofbauer (Ho) et les cytotrophoblastes extravilleux (TEV).

Par ailleurs, le profil d'expression de EG-VEGF et de PKR-1 sont assez proches, avec un pic d'expression entre la 8^{ème} et la 10^{ème} semaine de grossesse (10 à 12 SA), et une diminution drastique après. Ceci est tout à fait cohérent avec la modification de la pression en oxygène qui intervient après la 12^{ème} SA, avec une augmentation d'oxygénation de la chambre intervillieuse. De plus, nous constatons que la variabilité des mesures entre 8 et 12 SA est beaucoup plus importante qu'après (figure 2C et 4A de l'article), ce qui peut être expliqué par un phénomène dynamique et variable d'un individu à l'autre comme l'est la disparition des bouchons trophoblastiques et la transformation des artères spiralées, qui induit une augmentation progressive de la concentration en oxygène dans la chambre intervillieuse.

Nous avons d'ailleurs pu démontrer dans ce travail que la pression en oxygène était un régulateur de l'expression de EG-VEGF sur des trophoblastes en culture, mais aussi de l'expression de PKR-1. Nous avons montré que cette régulation de l'expression de EG-VEGF par l'hypoxie était

transcriptionnelle.

De plus, comme dans le *corpus luteum*, les localisations de EG-VEGF et VEGF sont complémentaires dans la villosité placentaire, ouvrant la possibilité à une complémentarité d'action des deux cytokines dans le développement placentaire.

Au total, ce travail et les immunohistochimies complémentaires ont démontré que le EG-VEGF était présent dans le placenta au cours du premier trimestre de la grossesse, que son expression et sa protéine variaient de façon inverse à la tension en oxygène du milieu environnant, avec un effondrement dès la période de normoxie. De plus, ses récepteurs étaient exprimés dans des types de trophoblastes différents, PKR-1 principalement exprimé dans les cytotrophoblastes villositaires et PKR-2 dans les trophoblastes extravilleux. Ceci nous a amené à émettre l'hypothèse que la persistance de EG-VEGF au-delà de la période physiologique de développement placentaire pourrait être un marqueur de persistance de l'hypoxie dans la chambre intervillieuse et être corrélé à la survenue d'une toxémie gravidique. Pendant la réalisation de ce travail, une publication concernant l'expression de EG-VEGF dans des placentas issus de grossesses normales et de grossesses toxémiques est parue (Chung, Song et al. 2004). Il s'agissait d'une mesure par RT-PCR quantitative, sur 16 et 18 échantillons de placentas (normaux et toxémiques, respectivement), non appariés en âge gestationnel. L'expression des récepteurs n'a pas été étudiée. Il n'a pas été mis en évidence de différence de niveau d'expression de EG-VEGF entre les deux types de placenta. Ceci n'est pas forcément contradictoire avec notre hypothèse, d'abord parce que nous ne savons pas si les accouchements des grossesses normales ont eu lieu au même terme que les accouchements de grossesses toxémiques, et nous savons que si la toxémie est un moment de « décompensation placentaire » provoquant une dysfonction endothéliale, le terme d'une grossesse normale peut être un état proche de la « décompensation placentaire » aussi. Ceci pourrait expliquer qu'il n'y ait pas de différence. De plus, nous ne savons pas ce qu'il en était des récepteurs...

Article 2

Placental expression of EG-VEGF and its receptors PKR1 (prokineticin receptor -1 and PKR2 throughout mouse gestation.

Pascale Hoffmann^{1,2,3,4}, Jean-Jacques Feige^{1,2,3} and Nadia Alfaidy.^{1,2,3}

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, EMI 01-05, Grenoble, France; ²Commissariat à l'Energie Atomique, Département Réponse et Dynamique Cellulaires, Laboratoire ANGIO, Grenoble, France; ³Université Joseph Fourier, Grenoble, France; ⁴ Centre Hospitalier Régional Universitaire de Grenoble, Service de Gynécologie, Obstétrique et Médecine de la Reproduction.

Abbreviated title: EG-VEGF, PKR-1 and PKR-2 expression in mouse placenta

Correspondance: Dr. Nadia ALFAIDY
INSERM EMI 01-05
DRDC/ ANGIO. CEA-Grenoble
17, Rue des Martyrs. 38054, Grenoble
Phone: (33) 4 38 78 35 01
FAX: (33) 4 38 78 50 58
Email: ALFAIDYBENHAROUGA@dsvsud.cea.fr

ABSTRACT

Preeclampsia (PE) is a threatening pathology of the pregnancy linked with placental invasion defects. Compelling evidence indicates that vascular endothelial growth factor (VEGF) is an important mediator of placental angiogenesis and appears to be dysregulated in PE. Recently we characterized the expression of EG-VEGF (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor), also known as prokineticin 1 (PK1) in human placenta during the first trimester of pregnancy and showed that this factor is likely to play an important role in human placentation. However, because it is impossible to prospectively study the placentation process in humans, it has been impossible to further characterize EG-VEGF expression throughout complete gestation and especially at critical gestational ages for PE development. In the present study we used mouse placenta to further characterize EG-VEGF expression throughout gestation. We investigated the pattern of expression of EG-VEGF and its receptors, PKR1 and PKR2 at the mRNA and protein levels. Immunohistochemistry was used to localize VEGF, EG-VEGF, PKR1 and PKR2 protein within mouse placenta at three different gestational ages. Our results show that EG-VEGF and VEGF exhibit different patterns of expression and different localizations within mouse placenta. EG-VEGF was mainly localized in the labyrinth layer whereas VEGF was mainly localized in glycogen and giant cells. EG-VEGF mRNA and protein levels were highest before 10.5 dpc whereas those of VEGF showed stable expression throughout mouse gestation. PKR1 protein was localized to the labyrinth layer and showed the same pattern of expression as EG-VEGF whereas PKR2 expression was maintained over 10.5 dpc with both trophoblastic and endothelial cell localizations. Altogether these findings suggest that EG-VEGF may have a direct effect on both endothelial and trophoblastic cells (cytotrophoblast, giant cells and glycogen cells) and is likely to play an important role in mouse placentation. The expression pattern of EG-VEGF and its complementary localization to that of VEGF suggest that this new factor might also be dysregulated in PE.

INTRODUCTION

Preeclampsia (PE) is still today one of the most common causes of perinatal and maternal morbidity and mortality (Sibai, Dekker et al. 2005). Its aetiology is still not known, but defective invasion by placental trophoblast cells into maternal decidua and spiral arteries seems to be a key initiating event. This leads to altered placental blood flow, which may also result in intra-uterine growth restriction (Burton and Jauniaux 2004; Chaddha, Viero et al. 2004). Normal placental development and vascularization depends on a tightly orchestrated coordination between the maternal decidua and zygote-derived cells. These developmental processes are thought to be mediated by angiogenic growth factors. Mouse models have demonstrated the importance of two families of ligands, namely vascular endothelial growth factors (VEGFs) and angiopoietins and their tyrosine kinase receptors in fetal and placental angiogenesis (Risau 1997; Yancopoulos, Klagsbrun et al. 1998; Neufeld, Cohen et al. 1999; Sibai, Dekker et al. 2005). The discrete phenotypes of the animals in which these genes have been invalidated suggest distinct roles for these two families with VEGF family members being important for the initial stages of vasculogenesis and angiogenesis and angiopoietins being involved in the latter stages of fetal blood vessel maturation. Low VEGF levels or production of VEGF antagonists such as the soluble form of its receptor-1 (VEGF-R1/flt-1) have been proposed as possible inducers of PE (Ziche, Maglione et al. 1997; Zhou, McMaster et al. 2002; Taylor, Grimwood et al. 2003; Levine, Maynard et al. 2004).

Recently, a new angiogenic factor named endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor (EG-VEGF) was characterized and sequenced (LeCouter, Kowalski et al. 2001). Its sequence presented no identity to that of VEGF family members but was totally identical to that of prokineticin-1 (PK1), a peptide that stimulates gastro-intestinal contraction. EG-VEGF was found to be expressed in testis, adrenal gland, ovary, and placenta (LeCouter, Kowalski et al.

2001). Interestingly, its angiogenic action appears to be restricted to endothelial cells derived from endocrine tissues (LeCouter, Kowalski et al. 2001). In endothelial cells isolated from steroidogenic tissues, EG-VEGF was shown to promote proliferation, survival and chemotaxis (LeCouter, Kowalski et al. 2001; LeCouter, Lin et al. 2002). Importantly, *in vivo* delivery of adenoviruses encoding EG-VEGF resulted in endocrine tissue-specific angiogenesis (LeCouter, Lin et al. 2003). EG-VEGF is a member of a class of proteins that also includes Bv8, a frog peptide purified from the skin secretion of the yellow-bellied toad, *Bombina variegata*, also known as prokineticin-2 (PK-2). Human EG-VEGF and Bv8 proteins present 83% identity, exert the same functions (LeCouter, Lin et al. 2003) and share the same G protein coupled receptors (PKRs), termed PKR1 and PKR2 (22). EG-VEGF expression in the placenta was briefly described in the initial report by LeCouter *et al.* (LeCouter, Kowalski et al. 2001). Recently, we characterized the expression of EG-VEGF in human placenta during the first trimester of pregnancy (Hoffmann, Feige et al. 2006) and showed that EG-VEGF/PK1, but not Bv8/PK2, is expressed in human placenta; is mainly localized to the syncytiotrophoblast layer, with the highest expression detected between the 8th and 10th week of human gestation, and is up-regulated by hypoxia. EG-VEGF immunolocalization appeared complementary to that of VEGF within human placental villi. These findings suggested to us that EG-VEGF is likely to play an important role in human placentation and might be deregulated in PE. However, because it is impossible to prospectively study the placentation process in humans, with most data being derived from placental bed biopsies at delivery, it has been impossible to further characterize EG-VEGF expression throughout complete gestation.

This prompted us to use the murine placenta to further characterize EG-VEGF expression throughout pregnancy. While some of the gross anatomy and physiology of mouse and human placentas are different, these two species show a similar hemochorial type of placentation and considerable histological and mechanistic similarities in placental development (Rossant and

Cross 2001; Georgiades, Ferguson-Smith et al. 2002; Malassine, Frendo et al. 2003). Consequently, studies of placentation in mice are likely to yield new insights into the pathogenesis of preeclampsia in women.

The aims of this study were therefore to examine the expression of EG-VEGF, VEGF, PKR1, and PKR2 in mouse placenta throughout gestation and to determine their sites of expression within the placenta.

MATERIAL AND METHODS

Tissue collection

All animal studies were approved by the institutional guidelines and the European Community for the Use of Experimental Animals. Three month-old pregnant female OF-1 mice were obtained from Charles River Laboratories (Les Oncins, France). The date of the presence of a vaginal plug was taken as day 0.5 post coitus (dpc). The pregnant females were maintained in the Animal Resources Center of our Department for one day and then sacrificed at various terms of gestation. Placentas were collected at 9.5, 10.5, 14.5 and 17.5 dpc. Briefly, whole uterus was removed, opened and each gestational sack was dissected on ice. Using binocular glasses, mouse fetuses, fetal membranes and umbilical cords were removed, and placentas were immediately placed in the appropriate medium.

For each gestational age examined, six different mice were used. From each mouse, at least six placentas were collected for RNA and protein extraction and two placentas were fixed in paraformaldehyde for histological studies. Mouse lung, kidney, testis and ovary were also collected from two month old male OF-1 mice.

RNA isolation and semi-quantitative RT-PCR

Immediately after dissection, total RNA was extracted from the placenta and from other tissues in 4 M guanidium isothiocyanate buffer using a rapid total RNA isolation system (RNAgents, Promega, Charbonnières, France). The integrity of extracted RNA was analyzed using an Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Reverse transcription was performed on 1µg total RNA with Superscript II-RnaseH reverse transcriptase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) under conditions recommended by the manufacturer.

Before PCR, quantities of cDNA samples were adjusted to yield equal amplifications of mRNA encoding the housekeeping enzyme hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT). HPRT,

EG-VEGF, Bv8, PKR1, PKR2 and VEGF primers (Table 1) were designed using the MacVector software. PCRs were performed in a final volume of 25 µl containing appropriate quantities of cDNAs in 1x PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200µM deoxynucleotide triphosphate, 400 nM each primer, 0.5 U Taq polymerase (Q. Biogene, Illkirch, France). In addition, several control reactions were routinely run in parallel including an RT-PCR reaction in the absence of reverse transcriptase to confirm the absence of genomic DNA contamination and RT reactions without RNA to check for reagent contamination. The PCR conditions were: step 1, 94⁰C for 1 min; step 2, 25-35 cycles at hybridization temperature indicated in table 1; and step 3, 72⁰C for 5 min. To ensure semi-quantitative results in the RT-PCR assays, the number of PCR cycles was selected to be in the linear range of amplification. PCR products were visualized after electrophoresis on 1.5 to 2 % gels by ethidium bromide staining.

Immunohistochemistry

Placental tissues were fixed for 24 h at 4°C in 4% (vol/vol) paraformaldehyde immediately after dissection, embedded in paraffin, and cut into 7 µm sections as previously described (Alfaidy, Gupta et al. 2002). To control tissue integrity and select the most representative sections, every 10th section was stained with hematoxylin and eosin. Adjacent sections were stained using specific antibodies and the avidin-biotin immunoperoxidase detection method. Endogenous peroxidase activity was quenched by pretreatment with 3% (vol/vol) hydrogen peroxide in methanol for 30 min. Tissue sections were then washed in PBS and incubated with normal goat serum (10%) that served as a blocking agent for nonspecific binding. Immunoreactive EG-VEGF was detected using rabbit anti-EG-VEGF (0,25 µg/ml, Phoenix Pharmaceuticals, Inc). Immunoreactive PKR1 and PKR2 were detected using in house rabbit polyclonal antibodies. The immunization was performed for our laboratory by Covalab (Lyon, France). For immunohistochemical detection, anti-PKR1 and anti-PKR2 antibodies were incubated with the tissue sections for 18 h at 4°C and used at final concentrations of 0.56µg/ml and 0.72 µg/ml

respectively. The tissue sections were subsequently washed three times with PBS and incubated with biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:250 dilution in blocking solution; Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) for 1 h at 4°C. After three PBS washes, the slides were incubated with an avidin-biotin complex (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA) for 1 h. After a final PBS wash, the immunoreactive proteins were visualized after the addition of 3,3'-diaminobenzidine (Dako, Trappes, France) for 2 min and then counterstained with hematoxylin. Control sections were treated with anti-PKR-1 and anti-PKR-2 antibodies that had been preabsorbed overnight at 4°C with the appropriate antigenic peptides. For negative control of EG-VEGF immunostaining, non specific immunoglobulins were used instead of the specific antibodies.

Western-blotting analysis

Placental tissues were snap-frozen in dry ice and stored at -80°C. Frozen placental samples were homogenized on ice for 1 min in RIPA lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate, 1% Triton X-100, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride, 5 µg/ml leupeptin, 5 µg/ml aprotinin] as previously described (Alfaidy, Li et al. 2003). The homogenates were centrifuged (15,000 g at 4°C) for 15 min, and the supernatants were collected. Proteins were also extracted from mouse kidney and liver using the same procedure. Protein concentrations were determined using the Bradford assay. Because of the weakness of the signal in the preliminary experiments, a specific protocol was set up to detect EG-VEGF protein. 70 µg of protein extracts were electrophoretically separated on 0.1% sodium dodecyl sulfate-17% polyacrylamide gels and electrically transferred onto 0.25-µm polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Bedford, MA). Appropriate transfer was confirmed by protein staining with Ponceau S (Sigma-Aldrich). The blots were washed with PBS-Tween 20 0.1% (PBS-T) and incubated overnight in blocking solution (5% skimmed milk in PBS-T). Subsequently, membranes were immunoblotted for 2 h with rabbit anti-EG-VEGF (Phoenix

Pharmaceuticals, Inc) (0.16 µg/ml) or with rabbit antibodies against PKR-1 or PKR-2, both used at a final concentration of 0.84 µg/ml. Blots were then rinsed three times with PBS-T and incubated with biotinylated goat anti-rabbit IgG (450 ng/ml, 1:2000, dilution in blocking solution; Dako) for 30 min. After three PBS-T washes, the membrane was incubated with a peroxidase-conjugated extravidin (1:2000 dilution in blocking solution; Sigma Aldrich) for 30 min. Blots were washed six times with PBS-T, and the antibody-antigen complex was detected using the enhanced chemiluminescence detection system (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK). The membranes were then exposed to radiographic films (Kodak Scientific Imaging Products, Rochester, NY). The intensities of immunoreactive bands were measured by scanning the photographic film and analyzing the image on a desktop computer using Scion Image software (version 4.0.2; Scion Corp., Frederick, MD). The mean pixel density for each band was analyzed to obtain relative OD units for EG-VEGF, PKR-1 and PKR-2 protein. To standardize for sample loading, the relative OD units for each band were standardized to the relative OD units of the total protein in the band as analyzed by Ponceau S staining.

Statistical analysis

All data are expressed as mean \pm SE. Statistical comparisons were made using one-way ANOVA test and Student's *t* test when appropriate. Calculations were performed using SigmaStat (Jandel Scientific Software, San Rafael, CA).

RESULTS

Differential expression of EG-VEGF, Bv8, PKR-1 and PKR-2 mRNAs in mouse tissues.

expression of mouse EG-VEGF and Bv8 mRNA have been reported in an extended panel of mouse tissues that did not include the placenta (LeCouter, Kowalski et al. 2001; LeCouter, Lin et al. 2003; LeCouter, Lin et al. 2003; LeCouter, Zlot et al. 2004; Cheng, Leslie et al. 2006). Using RT-PCR, we compared the levels of EG-VEGF, Bv8, PKR-1 and PKR-2 mRNA in mouse placenta and in tissues where their expression was reported to be important, such as kidney, liver, testis and ovary. As expected we found that EG-VEGF mRNA was present in the liver, kidney, testis and ovary. In the placenta, EG-VEGF levels were comparable to those in the ovary, whereas no transcript was detected in the testis. In contrast, Bv8 was exclusively expressed in the testis. PKR1 and PKR2 showed opposite patterns of expression with PKR1 being highly expressed in liver and ovary, and were more weakly expressed in testis and placenta, whereas PKR2 was highly expressed in the kidney, testis and placenta.

EG-VEGF and VEGF mRNA expression throughout mouse gestation.

Human VEGF and EG-VEGF are thought to be two important placental angiogenic factors (LeCouter and Ferrara 2002; LeCouter, Lin et al. 2002; LeCouter, Lin et al. 2002; Thomas, Keramidas et al. 2003). However, to date, nothing is known about their respective pattern of expression in mouse placenta during gestation. We thus examined the patterns of expression of VEGF and EG-VEGF at four different gestational ages (9.5, 10.5, 14.5, 17.5 dpc) using RT-PCR. As shown in Figure 2, EG-VEGF mRNA was detected at all gestational ages examined. Interestingly, its levels were much higher (up to 2 fold) between 9.5 and 10.5 dpc than during late gestation (14.5 and 17.5 dpc). Quantification of three independent experiments including 9 different mouse placentas for each time point showed that EG-VEGF mRNA levels are

significantly higher between 9.5 and 10.5 dpc as compared with gestational ages after this period ($P<0.001$) (Fig. 2A). Similar to EG-VEGF, VEGF mRNA was detected at all gestational ages, however, its pattern of mRNA expression was different from that of EG-VEGF with the highest levels observable after 10.5 dpc (Fig. 2B). These results suggest possible complementary functions for the two factors in the mouse placenta during gestation.

PKR1 and PKR2 mRNA expression throughout mouse gestation.

We then compared patterns of PKR1 and PKR2 mRNA expression in the same placentas. Our results show that both receptors are expressed throughout mouse gestation although with distinct patterns. Similarly to EG-VEGF expression, PKR1 mRNA expression was higher at 9.5 and 10.5 dpc than during late gestation (14.5 and 17.5 dpc) (Fig. 2C), whereas PKR2 peaked at 10.5 and 14.5 dpc (Fig. 2D). PKR1 and PKR2 thus appeared to present distinct patterns of expression suggesting that these receptors might be associated with different roles in mouse placentation.

Immunolocalization of VEGF and EG-VEGF in mouse placenta

Immunohistochemistry was then used to precise the pattern of expression of VEGF and EG-VEGF proteins in mouse placenta throughout gestation (figure 3). A total of 18 placentas were used (3 different placentas for each gestational age). Immunoreactive VEGF (Ir-VEGF) was observed since 9.5 dpc of gestation. Ir-VEGF was mainly observed in giant trophoblast cells. No staining was observed in the labyrinth layer. The staining was more intense at 14.5dpc with specific expression in the glycogen and giant trophoblast cells. At term, faint staining for VEGF protein was observed in all placental layers including the labyrinth.

Immunoreactive EG-VEGF (Ir-EG-VEGF) was observed since 9.5 dpc. At this gestational age, Ir-EG-VEGF was limited to the labyrinth layer with strong staining in the syncytiotrophoblasts. No staining was observed in the spongiotrophoblast cells, the trophoblastic giant cells, or the fetal

endothelial cells. (Figure 3). At advanced gestational ages (14.5 dpc), the intensity of EG-VEGF staining clearly decreased and completely disappeared at term. This immunohistochemical study demonstrates that VEGF and EG-VEGF are not expressed by the same cells in mouse placenta.

Immunolocalization of PKR1 and PKR2 in mouse placenta

EG-VEGF binds to two G protein-coupled receptors PKR1 and PKR2. Using in house antibodies against PKR1 and PKR2, we compared the localization and pattern of expression of the two receptors in mouse placenta throughout gestation, at 9.5, 14.5 and 17.5 dpc (Figure 4). Similarly to EG-VEGF, PKR1 showed the highest immunoreactivity at 9.5 and 10.5 dpc. No staining was observed beyond this gestational age. Ir-PKR1 was found in the labyrinth layer with strong staining in the syncytiotrophoblast. No staining was observed in endothelial cells within the labyrinth zone (undersized picture).

In contrast to PKR1, PKR2 immunoreactivity (Ir-PKR2) was plainly detectable in mouse placenta during all gestation with the strongest staining between 9.5 and 14.5 dpc (fig 4E-F). Ir-PKR2 was localized to the labyrinth layer, in the glycogen trophoblasts cells and the trophoblast giant cells. To control for antibodies specificity, preadsorption of anti-PKR1 and PKR-2 antibodies with an excess of immunizing peptides and incubation with preimmune sera were used. No staining was observed in mouse placenta under these conditions (Figure 4 G and I).

EG-VEGF, PKR-1 and PKR-2 protein expression throughout mouse gestation.

The pattern of EG-VEGF, PKR-1 and PKR-2 protein expression was then analyzed by Western blotting of protein extracts from placental tissue homogenates at 9.5, 14.5 and 17.5 dpc (n=16 placentas). EG-VEGF protein was detected as a major band of about 11 kDa. EG-VEGF protein was present since 9.5 dpc, peaked at 10.5 dpc and then significantly decreased. Quantification of

three independent experiments revealed a significant decrease in EG-VEGF expression levels after 10.5 dpc (Figure 5A).

PKR-1 protein was detected as a major band of 40 kDa. Similarly to EG-VEGF, PKR1 immunoreactivity was present since 9.5 dpc, peaked at 10.5 dpc and significantly decreased thereafter (Figure 5B). PKR2 was detected as a major band of 46 kDa. Its immunoreactivity was detected at all gestational ages with the highest levels being at 9.5 dpc. There was a trend to a decrease in PKR2 protein towards term but this was only significant between 9.5 dpc and term placentas (Figure 5C). Figures 6D and 6F demonstrated the specificity of the anti-PKR1 and anti-PKR2 antibodies. No signal was observed when PKR1 and PKR2 antibodies were preincubated with an excess (100x) of immunogenic peptide.

DISCUSSION

The present study characterizes the expression of VEGF, EG-VEGF and its G protein-coupled receptors PKR1 and PKR2 in mouse placenta throughout gestation and shows that EG-VEGF and VEGF have distinct spatio-temporal patterns of expression. We report that the expression of EG-VEGF and PKR1 peak during early mouse gestation (9.5-10.5 dpc), corresponding to the hypoxic period of placental development that precedes the establishment of the fetomaternal vascular connection. While EG-VEGF is mainly expressed in the labyrinth layer, we found that VEGF protein appears to be mainly localized to the cell types that are implicated in the invasion process, i.e. giant cells and glycogen cells. VEGF localization in giant cells is consistent with the unique report of Shweiki *et al* which reported the presence of VEGF mRNAs in the giant cells (Shweiki, Itin et al. 1993).. The differential spatiotemporal expression between VEGF and EG-VEGF has also been reported in other systems such as ovary and corpus luteum where both factors were expressed in adjacent but distinct compartments (Ferrara, Frantz et al. 2003; Samson, Peale et al. 2004). Interestingly, the data generated by this work are consistent with our recent study on placental EG-VEGF expression in early human pregnancy. Similarly to the observations in the mouse placenta, we observed that the pattern of EG-VEGF expression during the first trimester of human pregnancy presented a peak of expression just before the establishment of the fetomaternal circulation (between the 8th and 10th week of gestation) and a rapid decrease thereafter. Moreover, similarly to the observation in human placenta, we demonstrate here that VEGF and EG-VEGF exhibit opposite patterns of expression in mouse placenta.. Based on its specific pattern of expression and its absence of colocalization with VEGF, EG-VEGF appears to be a novel growth factor likely to play complementary biological roles to those of VEGF in placentation.

EG-VEGF acts via two G-protein coupled receptors PKR1 and PKR2 (Lin, Bullock et al. 2002). In the human placenta, we have shown that PKR1 is more abundant than PKR2 and that its pattern of expression was similar to that of EG-VEGF during the first trimester of pregnancy.

Interestingly, we show here that PKR1 exhibited also the same mRNA and protein patterns of expression as EG-VEGF with the highest levels peaking just before 10.5 dpc, corresponding to the end of the first trimester in the human pregnancy. Altogether, these data suggest that EG-VEGF might have distinct roles to play throughout gestation via the activation of PKR1 or PKR2 and that EG-VEGF/PKR1 complex might be mainly implicated in the early developmental events of the placenta. These assumptions are supported by the immunohistochemical localization of PKR1 and PKR2 in mouse placenta. We found that, while PKR1 was mainly localized to the cell types where EG-VEGF was highly expressed such as the syncytiotrophoblasts, PKR2 was strongly expressed by glycogen cells and giant cell; two type of cells responsible for the invasion of the maternal interstitial and vascular compartments respectively (Rossant and Cross 2001). PKR2 was also expressed by fetal endothelial cells during placental development. The presence of PKR1 and PKR2 on two different cell types suggests that EG-VEGF might play a dual role within the mouse placenta. By acting on syncytiotrophoblast cells EG-VEGF might contribute to the proliferation and the growth of the placenta, whereas through its action on glycogen and giant cells, EG-VEGF might control the invasive process of maternal decidua. The presence of PKR2 on fetal endothelial cells suggests that EG-VEGF might directly act on these cells supporting its pro-angiogenic effect previously reported in other systems (LeCouter, Lin et al. 2002; Ferrara, Frantz et al. 2003). These speculations need however to be experimentally verified in an *in vitro* models of placental cells.

As reported in human placenta, we also find that EG-VEGF protein is mainly localized to the syncytiotrophoblast cells in mouse placenta. The ontogeny study of EG-VEGF protein expression throughout mouse gestation showed a clear decrease of this factor after 10.5 dpc. This finding in the mouse placenta would strengthen our hypotheses about low abundance of EG-VEGF during the second and third trimester of human pregnancy. Therefore, we propose that the greatest role of EG-VEGF should occur within the first trimester of human pregnancy. Importantly, we know that

the origin of PE takes place during the first trimester of pregnancy and that any changes in protein expression after the establishment of the disease are considered to be consequences of the disease rather than causes of its development. Moreover, given the correlation between the pattern of EG-VEGF and PKR1 expression with the hypoxic period of placental development and knowing that failure in placental angiogenesis is thought to contribute to PE development, one can speculate on the potential implication of this factor and/or its receptors in the development of PE. However, only a prospective study examining the expression of EG-VEGF and/or PKR1 during early development of the pathology will provide an answer to this question. Mouse models of PE (Podjarny, Losonczy et al. 2004), may be particularly appropriate to check this hypothesis.

Comparison of EG-VEGF mRNA levels in the placenta with other mouse tissues showed that EG-VEGF is as abundant in the placenta and ovary as compared to the liver and the kidney suggesting that EG-VEGF expression is not restricted to endocrine tissues as this was previously reported (LeCouter, Lin et al. 2002; Ferrara, Frantz et al. 2003). Moreover we found that mouse liver and kidney express important levels of PKR1 and PKR2 transcripts, respectively, suggesting that EG-VEGF might have direct effects in these tissues. Importantly, preeclamptic women often undergo kidney and liver failure (LeCouter, Lin et al. 2002; Ferrara, Frantz et al. 2003); therefore it is plausible to suggest that defects in EG-VEGF and /or PKR1 and PKR2 might also contribute to organ dysfunctions often associated with PE.

Taken together the data generated by this work reveal that, besides VEGF, the most studied factor in human placentation, other new factors, such as EG-VEGF and its receptors PKR1 and PKR2 should draw our attention for their importance in the success of pregnancy and their potential implication in the development of placental pathologies such as PE.

TABLE 1

| Gene | Primers | Size of the product | T° (C) | Annealing time (min) | # of cycles |
|---------|--|---------------------|--------|----------------------|-------------|
| HPRT | F:gctggtgaaaaggacctct R:cacaggactagaacacctgc | 250 | 55 | 1,5 | 24 |
| EG-VEGF | f:atcccttcttgaggaaacg r:gcccacactgtcacaactcag | 348 | 57,6 | 1,5 | 32 |
| BV8 | f:tgtgctgtgctgtcagtatctggg r:tggaaagtcaaggaagggggag | 322 | 57,6 | 0,5 | 32 |
| PKR1 | f:aataccacagacaccttcaccgac r:tggcagcaaagaaagtccgag | 154 | 59,5 | 1,5 | 30 |
| PKR2 | f:gcggcattggcaactttgtcttg r:acgataacgaggatggtttctgtgg | 401 | 59,5 | 1,5 | 30 |
| VEGF* | f:tgaagtgatcaagttcatggacgt r:tcacggccttggcttgtc | | 59 | 1,5 | 28 |

LEGENDS TO THE FIGURES

Figure 1: Distribution of EG-VEGF, Bv8, PKR1 and PKR2 mRNA in mouse liver, kidney, ovary, testis and placenta (9.5 dpc). Representative ethidium bromide staining of EG-VEGF, Bv8, PKR1 and PKR2 mRNAs amplified by RT-PCR are shown. mRNA level values were normalized to HPRT mRNA levels

Figure 2: Patterns of placental EG-VEGF (A), VEGF (B), PKR1 (C) and PKR2 (D) mRNA expression throughout mouse gestation. The expression levels of the selected mRNAs were quantified by semi-quantitative RT-PCR and normalized to the HPRT RNA levels as described in Materials and Methods. The relative expression levels of each gene were plotted as function of gestational age. A total of 36 mouse (nine different placenta for each gestational age examined) from 9.5 to 17.5 dpc were used. Data are expressed as mean \pm SE. Values overwritten with different letters are significantly different from each other ($P < 0.05$).

Figure 3: Comparison of VEGF and EG-VEGF immunolocalization in mouse placenta. A total of 18 placentas, from 9.5 to 17.5 dpc of gestation were used (three different placental samples for each gestational age). **A, B and C** show representative VEGF immunoreactivity at 9.5, 14.5 dpc and 17.5 dpc of gestation, respectively. **D, E and F** show EG-VEGF immunoreactivity at the same gestational ages. Note that VEGF and EG-VEGF exhibit complementary sites of immunoreactivity in mouse placenta at 9.5 dpc. All sections were counterstained with heamatoxylin. Labyrinth (L), Glycogen cells (GC), Giant cells (Gi), spongiotrophoblast (Sp). Scale bar = 50 μ m

Figure 4. Comparison of PKR1 and PKR2 immunolocalization in mouse placenta A total of 18 placentas, from 9.5 to 17.5 dpc of gestation were used (three different placental samples for each gestational age). **A, B and C** show representative PKR1 immunoreactivity at 9.5, 14.5 dpc and 17.5 dpc of gestation, respectively. **D, E and F** show PKR2 immunoreactivity at the same gestational

ages. Undersized photographs in **G** and **H** represent negative controls treated with antigen neutralized anti-PKR1 and anti-PKR2 respectively. Note that PKR1 immunoreactivity was stronger at 9.5 dpc compared to the rest of gestation with main localization in the labyrinth and that PKR2 expression is maintained over that gestational age with a strong expression in placental endothelial cells (**I, J, K**). All sections were counterstained with heamatoxylin. Labyrinth (L), Glycogen cells (GC), Giant cells (Gi), spongiotrophoblast (Sp). Scale bar = 50 μ m

Figure 5. EG-VEGF, PKR1 and PKR2 protein expression in mouse placenta during gestation. **A, B, C** show representative Western blots for EG-VEGF, PKR1 and PKR2 respectively with the corresponding quantification of their relative optical densities (OD) normalized to the relative OD units of the total protein in the band as analyzed by Ponceau S (n=24 different placentas from 9.5 to 17.5 dpc of gestation). Data are mean \pm SE. *, $P= 0.05$. Values overwritten with different letters are significantly different from each other ($P < 0.05$). **D** and **E** show the specificity of PKR1 and PKR2 antibodies respectively. The specificity was tested in the presence of immunogen peptide at a concentration 100 times the concentration of PKR1 and PKR2 antibodies used in this study.

Acknowledgments

This work was supported by INSERM (EMI 01–05) and Commissariat à l’Energie Atomique (DSV/DRDC/ANGIO).

BIBLIOGRAPHY

1. Sibai, B., G. Dekker, and M. Kupferminc, *Pre-eclampsia*. Lancet, 2005. **365**(9461): p. 785-99.
2. Burton, G.J. and E. Jauniaux, *Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia*. J Soc Gynecol Investig, 2004. **11**(6): p. 342-52.
3. Chaddha, V., et al., *Developmental biology of the placenta and the origins of placental insufficiency*. Semin Fetal Neonatal Med, 2004. **9**(5): p. 357-69.
4. Neufeld, G., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors*. Faseb J, 1999. **13**(1): p. 9-22.
5. Risau, W., *Mechanisms of angiogenesis*. Nature, 1997. **386**(6626): p. 671-4.
6. Yancopoulos, G.D., M. Klagsbrun, and J. Folkman, *Vasculogenesis, angiogenesis, and growth factors: ephrins enter the fray at the border*. Cell, 1998. **93**(5): p. 661-4.
7. Levine, R.J., et al., *Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia*. N Engl J Med, 2004. **350**(7): p. 672-83.
8. Taylor, R.N., et al., *Longitudinal serum concentrations of placental growth factor: evidence for abnormal placental angiogenesis in pathologic pregnancies*. Am J Obstet Gynecol, 2003. **188**(1): p. 177-82.
9. Zhou, Y., et al., *Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome*. Am J Pathol, 2002. **160**(4): p. 1405-23.
10. Ziche, M., et al., *Placenta growth factor-1 is chemotactic, mitogenic, and angiogenic*. Lab Invest, 1997. **76**(4): p. 517-31.
11. LeCouter, J., et al., *Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium*. Nature, 2001. **412**(6850): p. 877-84.
12. LeCouter, J., R. Lin, and N. Ferrara, *Endocrine gland-derived VEGF and the emerging hypothesis of organ-specific regulation of angiogenesis*. Nat Med, 2002. **8**(9): p. 913-7.
13. LeCouter, J., et al., *The endocrine-gland-derived VEGF homologue Bv8 promotes angiogenesis in the testis: Localization of Bv8 receptors to endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(5): p. 2685-90.
14. Hoffmann, P., J.J. Feige, and N. Alfaidy, *Expression and oxygen regulation of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 and its receptors in human placenta during early pregnancy*. Endocrinology, 2006. **147**(4): p. 1675-84.
15. Georgiades, P., A.C. Ferguson-Smith, and G.J. Burton, *Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae*. Placenta, 2002. **23**(1): p. 3-19.
16. Malassine, A., J.L. Frendo, and D. Evain-Brion, *A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model*. Hum Reprod Update, 2003. **9**(6): p. 531-9.
17. Rossant, J. and J.C. Cross, *Placental development: lessons from mouse mutants*. Nat Rev Genet, 2001. **2**(7): p. 538-48.
18. Alfaidy, N., et al., *Oxygen regulation of placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2: physiological and pathological implications*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(10): p. 4797-805.

19. Alfai, N., et al., *Late gestation increase in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 expression in human fetal membranes: a novel intrauterine source of cortisol*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(10): p. 5033-8.
20. Cheng, M.Y., F.M. Leslie, and Q.Y. Zhou, *Expression of prokineticins and their receptors in the adult mouse brain*. J Comp Neurol, 2006. **498**(6): p. 796-809.
21. LeCouter, J., et al., *Mouse endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor: a distinct expression pattern from its human ortholog suggests different roles as a regulator of organ-specific angiogenesis*. Endocrinology, 2003. **144**(6): p. 2606-16.
22. LeCouter, J., et al., *Bv8 and endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor stimulate hematopoiesis and hematopoietic cell mobilization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(48): p. 16813-8.
23. LeCouter, J. and N. Ferrara, *EG-VEGF and the concept of tissue-specific angiogenic growth factors*. Semin Cell Dev Biol, 2002. **13**(1): p. 3-8.
24. LeCouter, J., R. Lin, and N. Ferrara, *The role of EG-VEGF in the regulation of angiogenesis in endocrine glands*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2002. **67**: p. 217-21.
25. Thomas, M., et al., *Role of adrenocorticotrophic hormone in the development and maintenance of the adrenal cortical vasculature*. Microsc Res Tech, 2003. **61**(3): p. 247-51.
26. Shweiki, D., et al., *Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis*. J Clin Invest, 1993. **91**(5): p. 2235-43.
27. Ferrara, N., et al., *Differential expression of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor (VEGF) and endocrine gland-derived VEGF in normal and polycystic human ovaries*. Am J Pathol, 2003. **162**(6): p. 1881-93.
28. Samson, M., et al., *Human endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor: expression early in development and in Leydig cell tumors suggests roles in normal and pathological testis angiogenesis*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(8): p. 4078-88.
29. Lin, D.C., et al., *Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor*. J Biol Chem, 2002. **277**(22): p. 19276-80.

Figure 1

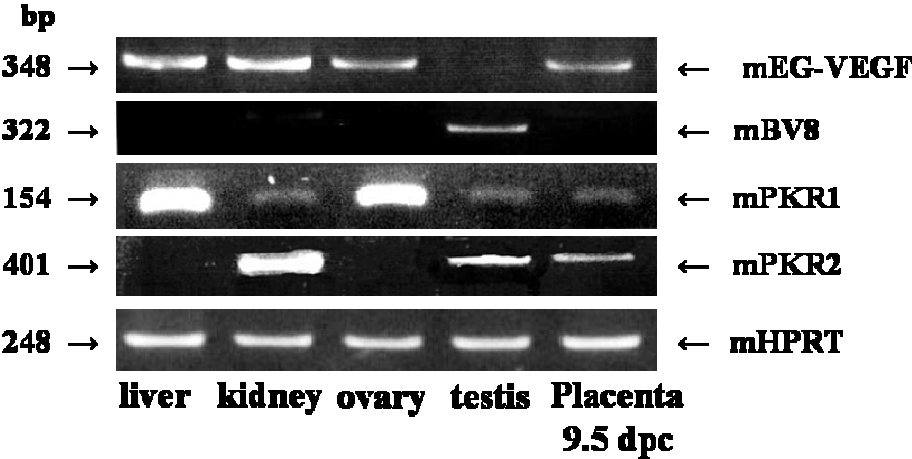
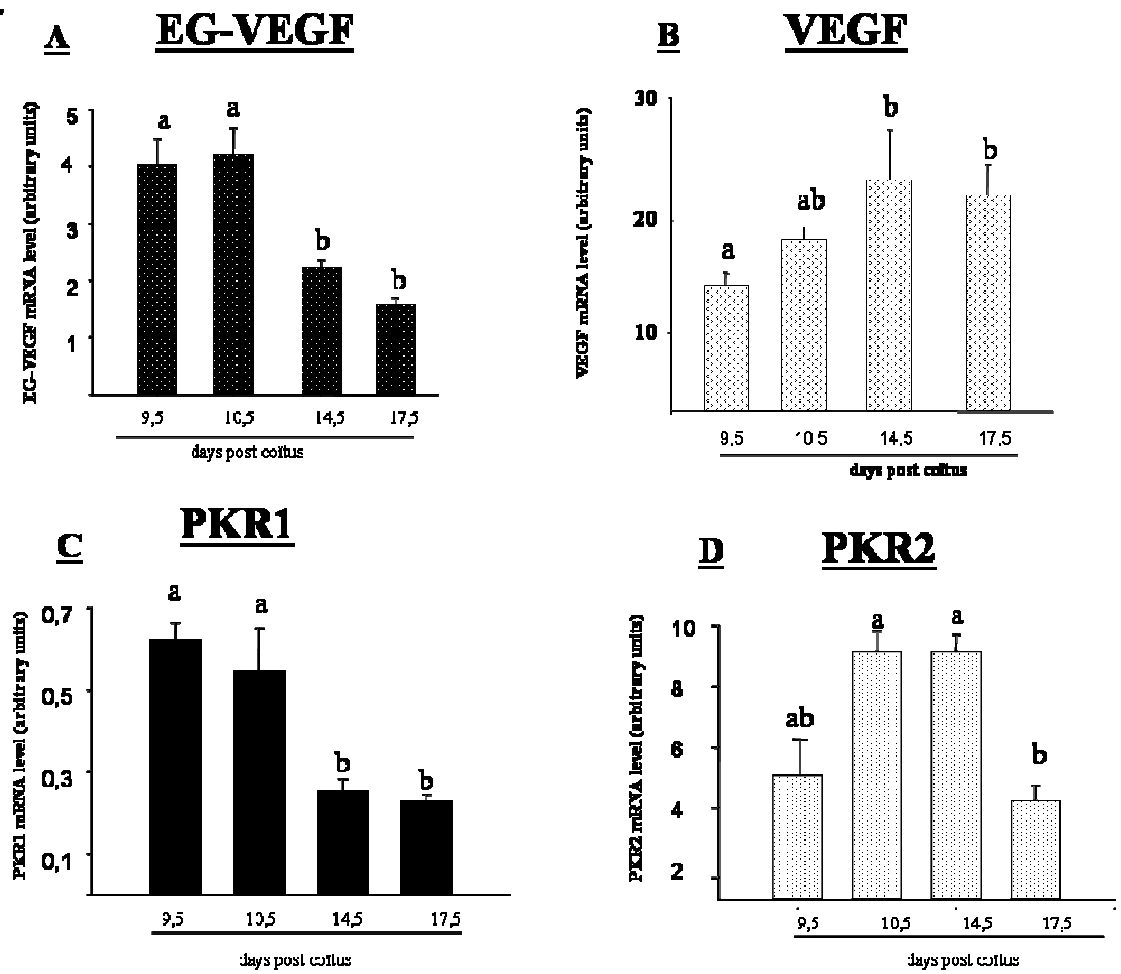


Figure 2



VEGF

EG-VEGF

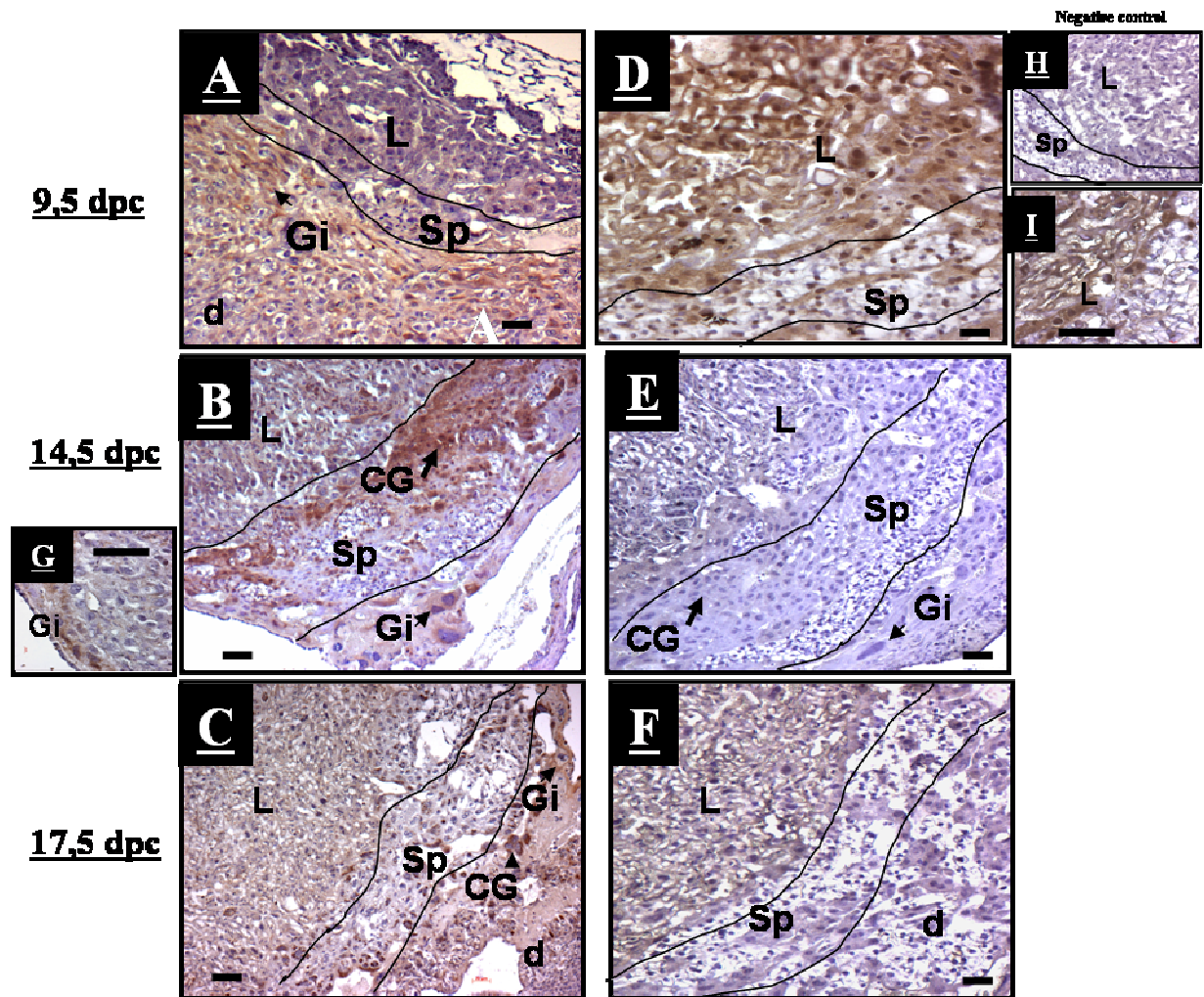


Figure 4

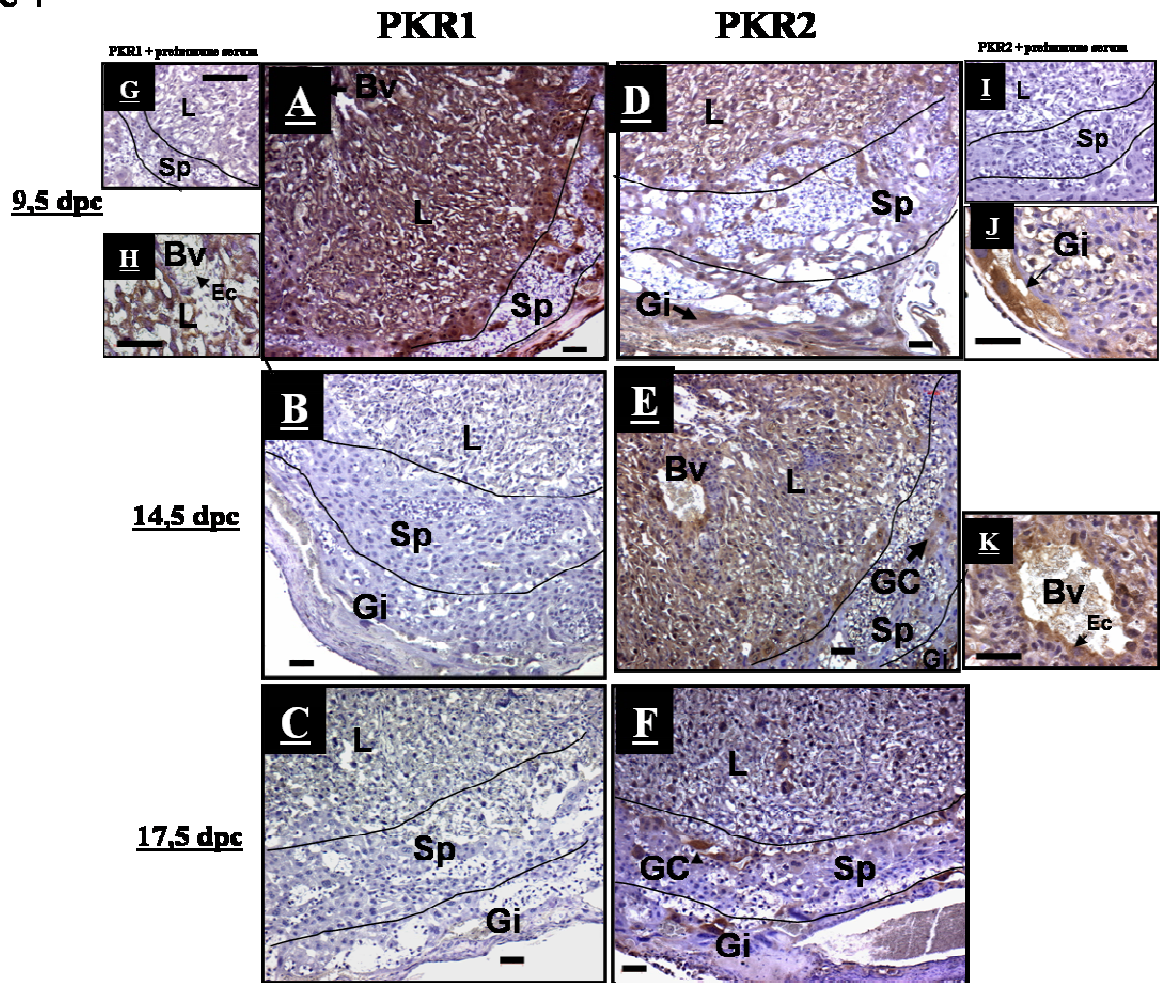
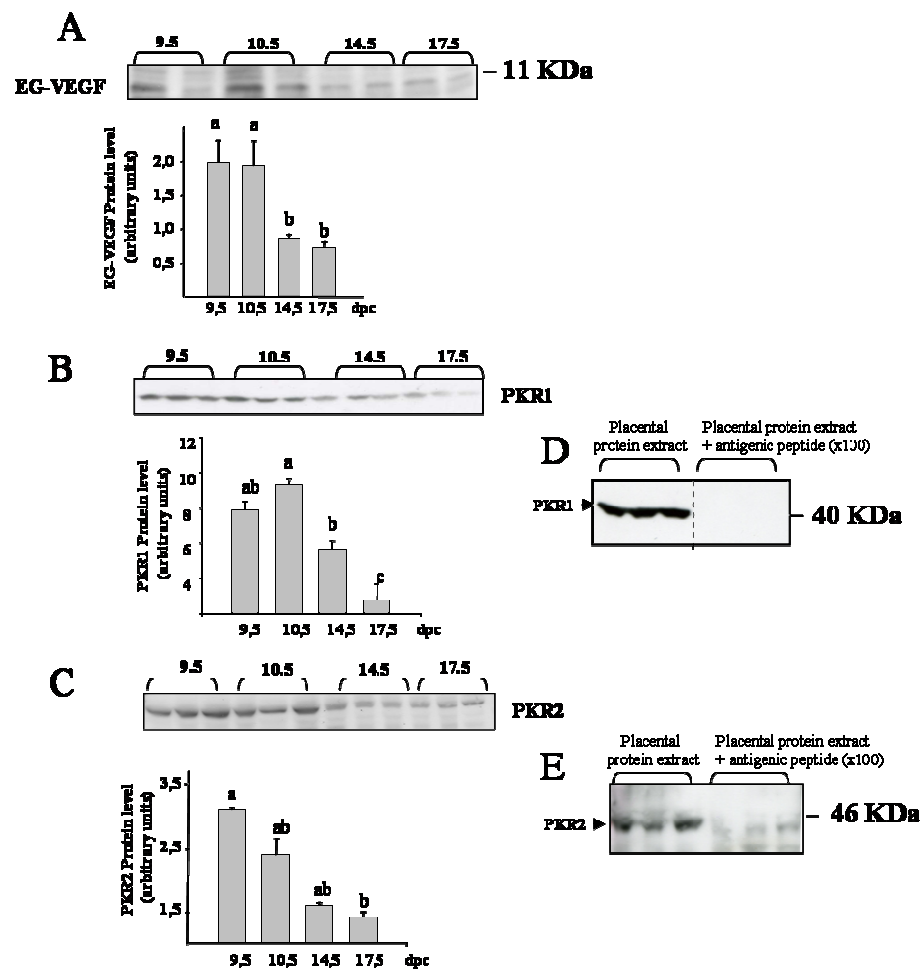


Figure 5



Discussion

Dans ce travail, nous avons pu étudier l'expression et la localisation du EG-VEGF et de ses récepteurs tout au long de la gestation murine. Plusieurs points communs ont été retrouvés avec la première étude menée au cours du premier trimestre de la grossesse chez l'humain. D'abord, la localisation de EG-VEGF est le labyrinthe, qui correspond au placenta hémochorial chez la femme et, comme chez l'humain, chez la souris la diminution de l'expression de EG-VEGF et la diminution de sa protéine a lieu après que la pression en oxygène au sein du labyrinthe ait augmenté, c'est-à-dire après le 10,5^{ème} jpc. Ensuite, la localisation du EG-VEGF et du PKR-1 laissent également penser à un rôle direct du EG-VEGF sur les trophoblastes. Nous n'avons malheureusement pas réussi à mettre au point de cultures primaires de CT murins, de même que les tentatives de cultures organotypiques d'explants placentaires n'ont pas abouti, ce qui ne nous a pas permis de confirmer notre hypothèse. Nous avons également noté que le patron d'expression et la localisation du PKR-2 étaient différents de ceux du PKR-1 et que la présence de PKR-2 sur les cellules endothéliales du placenta murin, laissait envisager, comme chez l'humain, un rôle angiogène de EG-VEGF sur le développement placentaire qui passerait par le PKR-2. Enfin, les localisations de EG-VEGF et de VEGF sont complémentaires dans le placenta de souris, comme chez l'humain, ce qui nous fait penser que leurs rôles, bien que proches sur les cellules endothéliales, pourraient peut-être plutôt se compléter dans le développement placentaire humain et murin.

Au total, les résultats que nous avons trouvés chez la souris nous font espérer que ce sera un modèle adéquat pour étudier les modifications d'expression du EG-VEGF qui pourraient survenir dans la toxémie gravidique, ou pour étudier les effets de son expression prolongée au-delà de 10,5jpc, par exemple par délivrance adénovirale.

Tout récemment, Davidson et son équipe ont mis au point une lignée de souris issues du croisement sur plusieurs générations de souris hypertendues (lignée BPH/2) et obtenu la lignée BPH/5, qui possède une tension basale légèrement supérieure à la normale en dehors de la

grossesse (Davisson, Hoffmann et al. 2002) et est le premier modèle à développer lors de la grossesse (après le 14,5^{ème} jpc) une symptomatologie évocatrice de toxémie gravidique avec hypertension, protéinurie, glomérulosclérose et retard de croissance intra-utérin. Les symptômes régressent 2 jours après la naissance de la portée. Il est intéressant de noter que l'analyse fine du développement placentaire chez ces souris a montré un défaut précoce (10,5 jpc), avec labyrinthe limité et diminution de l'envahissement de la zone de jonction (Dokras, Hoffmann et al. 2006). Les répercussions hémodynamiques visualisées par les dopplers des artères utérines ont montré à 16,5jpc des différences très nettes entre les BPH/5 et une lignée non hypertendue (C57). En effet, les souris BPH5 avaient un index systolique quasi nul et une augmentation de l'index de résistance. Il était déjà largement soupçonné que la toxémie gravidique prenait source dans les défauts précoces de placentation. Ce modèle renforce encore toutes les évidences qui nous orientaient dans ce sens.

Il serait extrêmement intéressant de pouvoir étudier le patron d'expression spatio-temporel de notre facteur d'intérêt, EG-VEGF, et de ces récepteurs dans les placentas des souris BPH/5.

Nous nous attendrions en effet à ce que son expression soit prolongée au-delà de 10,5jpc. Concernant les récepteurs, il serait possible que l'expression de PKR-1 persiste également dans le labyrinthe, puisqu'il est probable que la pression en oxygène reste plus basse plus longtemps du fait d'un défaut de modification de la vascularisation maternelle et que nous avons montré chez l'humain que l'hypoxie induisait une augmentation de EG-VEGF et de PKR-1 dans les trophoblastes en culture. Concernant le PKR-2, présent également dans les cellules endothéliales et les cellules à glycogène, il est difficile de conclure puisque nous ne savons pas comment PKR-2 participe à l'angiogenèse placentaire à proprement parler...

Les souris BPH/5 sont brevetées aux Etats-Unis (patent 70 45674) et nous espérons pouvoir bientôt travailler sur ce modèle.

Article 3, en cours d'élaboration

Suite à nos premières études sur l'expression et la localisation du EG-VEGF et de ses récepteurs dans le placenta humain et murin, il nous a semblé très important de pouvoir explorer leurs fonctions non angiogènes. Il semble en effet très clair que le EG-VEGF et ses récepteurs PKR-1 et PKR-2 sont exprimés par les différents trophoblastes composant le placenta.

Nous avons voulu explorer le rôle villositaire du EG-VEGF sur les cytotrophoblastes en culture, et également le rôle extravillositaire du EG-VEGF par étude sur culture de trophoblastes extravilleux transformés (les HTR-sV-néo) et explants en culture organotypique. Nous avons également, quand les anticorps anti-PKR-1 et -2 ont été disponibles, confirmé les données de leur expression au cours du premier trimestre de la grossesse humaine. Comme les ARNm, les protéines de PKR-1 sont exprimés majoritairement à 9,5 et 10,5 jpc, puis diminuent ensuite, alors que les protéines de PKR-2 ne diminuent pas à 12 semaines de gestation. L'image d'un western blot représentatif se trouve figure 35, en regard des quantifications ARN présentées dans l'article 1.

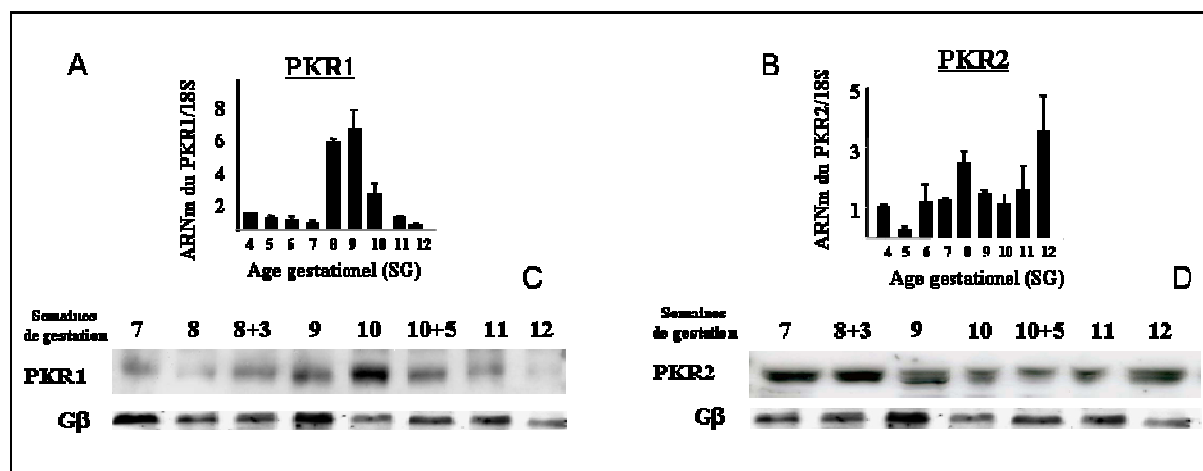


Figure 35 : expression protéique de PKR-1 et PKR-2

Western blot représentatif de trois différentes expériences, réalisées chaque fois avec huit placentas de 7 à 12 semaines de gestation (n= 24 *placentae* différents). L'anticorps anti-PKR-1 (C) et l'anticorps anti-PKR-2 (D) ont été dilués au 1/400^{ème}. Chaque puit a été chargé avec 70 µg de protéines, dans un gel à 12% de polyacrylamide; puis un transfert sur nitrocellulose est effectué. Le protocole utilisé est le même que celui décrit dans matériel et méthode de l'article 1. La standardisation a été effectuée par rapport à la protéine Gβ. En regard au dessus se trouvent les quantifications des ARNm de PKR-1 (A) et PKR-2 (B)

Rôle mitogène de EG-VEGF sur les cytotrophoblastes villositaires.

Nous avons testé ce rôle par deux méthodes, l'incorporation de thymidine tritiée sur culture primaires de cytotrophoblastes isolés et le marquage Ki67 après culture de cytotrophoblastes isolés pendant 72 heures. Les résultats sont présentés figure 36. On remarque que le traitement par EG-VEGF produit une augmentation très nette de la prolifération des cytotrophoblastes, dose-dépendante, visualisée par l'incorporation de thymidine tritiée et que l'effet sur la prolifération est confirmé par le doublage de l'index de prolifération grâce au marquage Ki67.

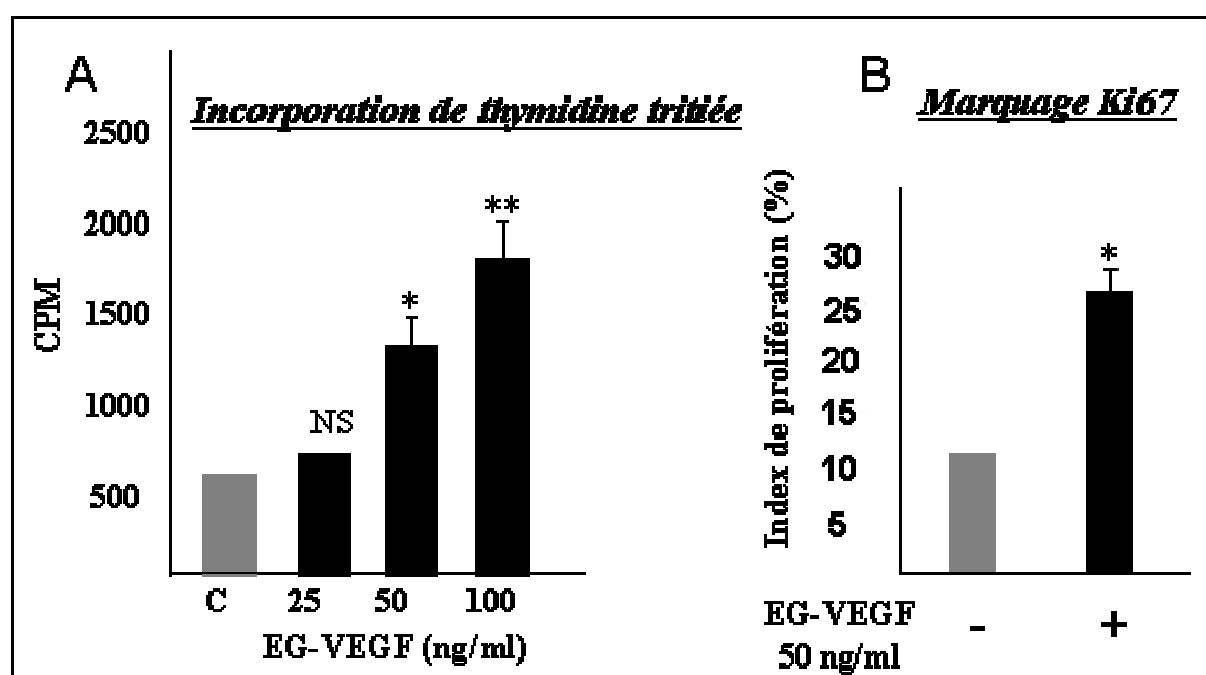


Figure 36: Effet du EG-VEGF sur la prolifération des cytotrophoblastes.

Les cultures proviennent de l'isolement de cytotrophoblastes issus de *placentae* entre: 9 à 10 SA. Les cytotrophoblastes ont d'abord bénéficié d'une période d'attachement de 18h puis déprivation en sérum pendant 7h (0,2%FBS).

(A) Pour la mesure de l'incorporation de thymidine tritiée, les cultures ont ensuite été traitées par véhicule +/- EG-VEGF (25 à 100 ng/ml) pendant 24h en présence de thymidine tritiée (0,5µci/ml). Puis les cellules ont été lysées (TCA puis NaOH et SDS) et le contenu de chaque puit de culture a été compté dans le scintillant. Les expériences ont été faites trois fois, avec un triplicat pour chaque condition. Le schéma représente la quantification d'une expérience, avec pour chaque condition la moyenne des trois mesures +/- erreur standard.

(B) pour la mesure de l'index de prolifération, après déprivation en sérum, les cellules étaient traitées par véhicule +/- EG-VEGF 50ng/ml pendant 24 heures. Les expériences ont été faites trois fois. Les cellules de dix champs différents pour chacune des conditions ont été comptées puis le pourcentage de cellules marquées sur le nombre total de cellules a été déterminé, représentant l'index de prolifération.

Ces résultats nous apprennent que le EG-VEGF a un rôle stimulateur sur la prolifération des cytotrophoblastes. Nous n'avons pas encore mesuré son effet sur la transformation en syncytiotrophoblastes.

Rôle de EG-VEGF sur les cytotrophoblastes extravillositaires

Nous avons testé le rôle de EG-VEGF sur les trophoblastes extravilloux grâce à deux systèmes : la lignée transformée de trophoblastes humains extravilloux, les HTR-sVnéo et le système de culture organotypique en chambre de Boyden. Ce dernier système est adapté des expériences de Caniggia *et al* (Caniggia, Grisaru-Gravnosky *et al.* 1999; Caniggia, Mostachfi *et al.* 2000)

Le traitement par EG-VEGF à 50ng/ml des HTR-sVnéo induit une diminution de la prolifération (figure 37) et de la migration (figure 38). De plus, en culture organotypique d'explants placentaires issus de grossesses de 12 SA, le traitement par EG-VEGF inhibe la croissance des bourgeons villositaires dans le matrigel® (figure 39). On peut donc conclure que le EG-VEGF inhibe la prolifération, la migration et l'invasion des trophoblastes extravilloux.

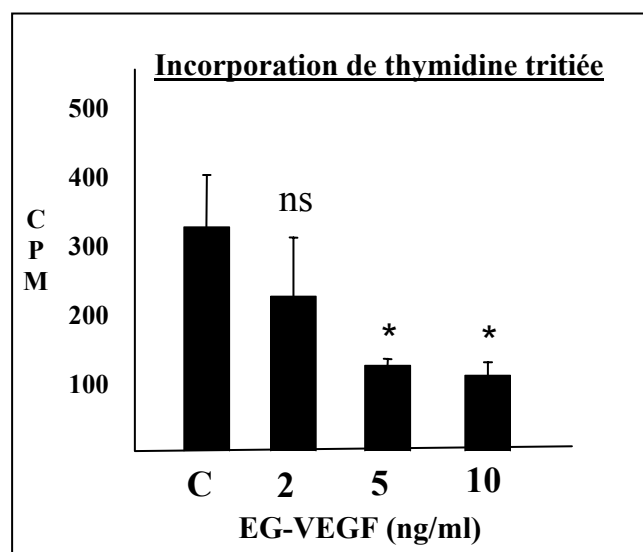


Figure 37 : effet de EG-VEGF sur la prolifération des trophoblastes extravilloux HTR-SVnéo.

Les cellules sont mise en culture à la densité de 250 000 cellules par puit en boîtes de 24 puits, après 16 heures d'attachement et 7 heures de déprivation en sérum, elles sont traitées par véhicule +/- EG-VEGF de 2 à 5 ng/ml en présence de thymidine tritiée (0,5µci/ml) pendant 24 heures. Le décompte de l'incorporation est fait selon le même protocole que figure 34. Expérience réalisée trois fois, en triplicate pour chaque condition. Chaque valeur correspond à la moyenne des trois mesures d'une condition +/- l'erreur standard.

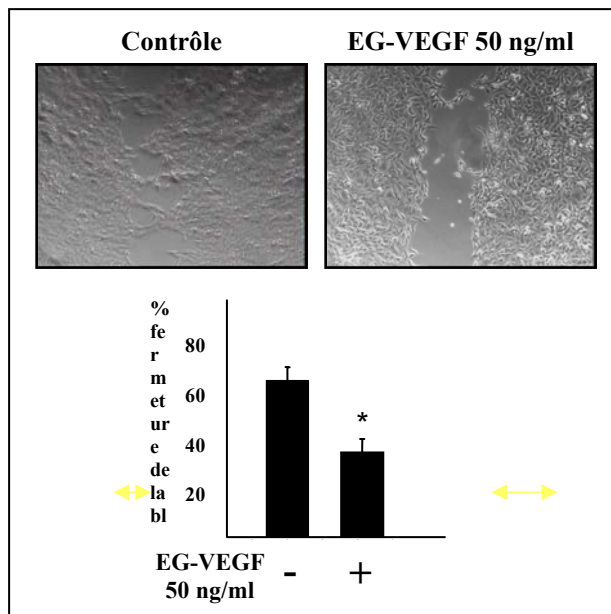


Figure 38 : effet de EG-VEGF sur la migration des trophoblastes extravilloux HTR-SVneo à 24 heures.

Les cellules sont mises en culture à la densité de 500 000 cellules/puit dans des boîtes de 24 puits. Après avoir atteint la confluence, et avoir bénéficié de 7 heures de déprivation de sérum, elles sont blessées par un cône puis traitées par véhicule +/- EG-VEGF 50ng/ml. Les blessures sont photographiées régulièrement pendant 24 heures. Le pourcentage de fermeture est alors calculé (taille initiale – taille finale/taille initiale). L'expérience a été faite trois fois, en triplicate pour chaque condition à chaque fois. Les valeurs sont la moyenne des trois mesures +/- erreur standard.

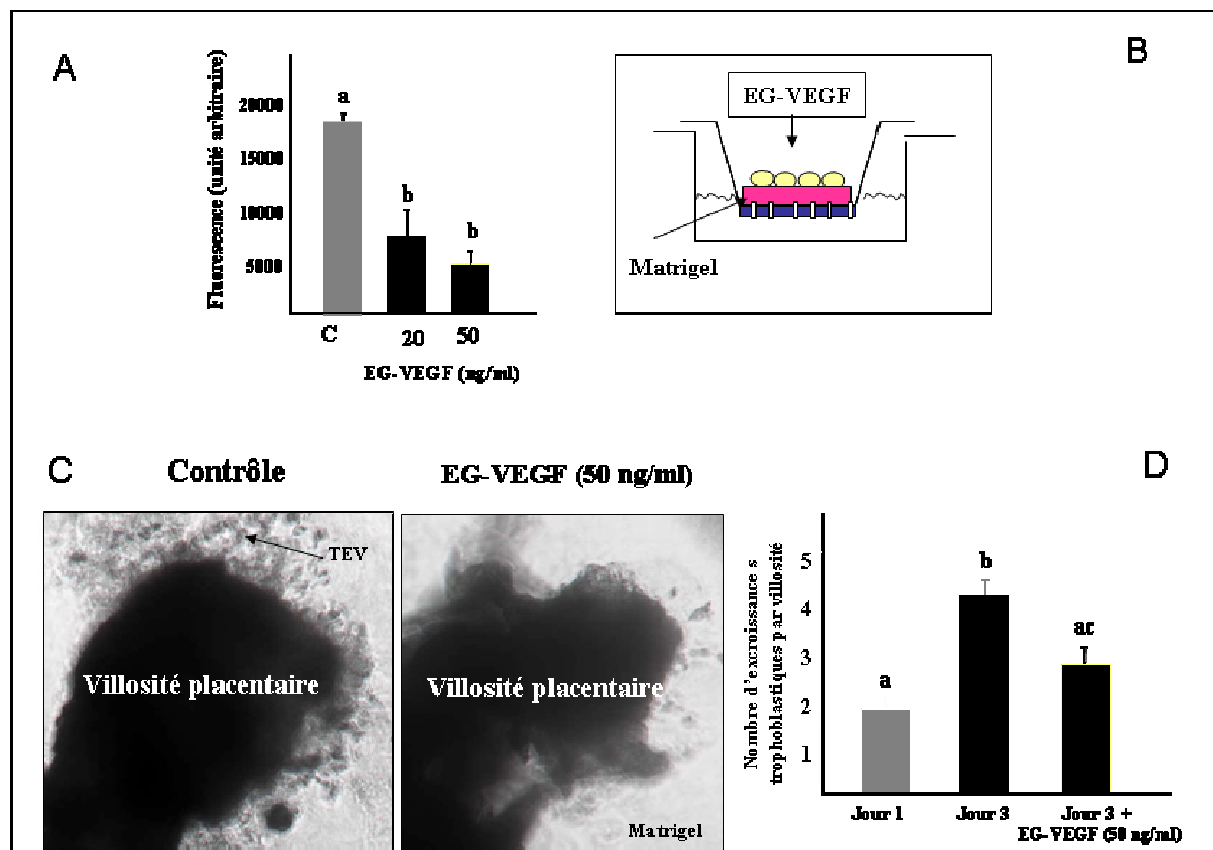


Figure 39 : effet de EG-VEGF sur l'invasion des trophoblastes extravilloux.

A : culture de HTR-sVneo dans des systèmes « fluorobloc » et mesure de la fluorescence qui a traversé la membrane opaque inférieure après 24 heures de traitement par EG-VEGF. B : système utilisé pour les cultures d'explants. C : Des fragments villositaires disséqués à partir de placentas d'interruption de grossesse de 12 SA sont mis en culture sur la partie supérieure d'une chambre de Boyden préalablement recouverte par du matrigel® et traitée par véhicule +/- EG-VEGF dans du DMEM/F12. Le nombre d'excroissances par villosité terminale est compté après un jour puis trois jours de traitement. Les chiffres représentent la moyenne de trois valeurs pour chaque condition (triplicate). L'expérience a été faite trois fois, avec trois placentas différents.

Conclusion

Au début de ce travail, nous savions que le EG-VEGF s'exprimait dans le placenta, et il était principalement connu pour son rôle angiogène et spécifique de l'endothélium des glandes endocrines. Depuis, d'autres rôles lui ont été reconnus, comme un rôle de stimulateur de l'hématopoïèse et inducteur de la différenciation et de l'activation des monocytes (LeCouter, Zlot et al. 2004) (Dorsch, Qiu et al. 2005), un rôle dans les mécanismes de nociception (Negri, Lattanzi et al. 2006), dans le maintien du rythme circadien (Cheng, Bullock et al. 2002; Lambert, Machida et al. 2005), le comportement d'ingestion (Negri, Lattanzi et al. 2004) et bien sûr le premier rôle pour lequel il était connu, le rôle sur la motricité intestinale (Li, Bullock et al. 2001).

Nous avons montré qu'il jouait un rôle dans l'établissement du placenta, à travers une action complexe et différenciée sur les différents types de trophoblastes. Il possède un rôle prolifératif sur les cytotrophoblastes villositaires, et l'on peut donc penser que lors de la période de développement placentaire en hypoxie, au moment où son expression est plus importante, il participe à la constitution des colonnes d'invasion trophoblastique, préparant « une réserve » de CT pour la phase d'invasion qui sera physiologiquement stimulée par la normoxie. Cette action passe probablement par le récepteur PKR-1, qui est localisé dans les cytotrophoblastes, très proches des syncytiotrophoblastes où est exprimé le EG-VEGF. Il possède également un rôle différent sur les trophoblastes extravilleux, dont il inhibe la prolifération, la migration et l'invasion. Ceci n'est pas incompatible avec le rôle qu'il a sur les cytotrophoblastes. En effet, durant la première période de développement placentaire, en hypoxie, il serait probablement délétère que l'invasion commence trop tôt, avant que le « stock » de cytotrophoblastes de la colonne d'invasion ne soit assuré, puisque les modifications vasculaires induites raccourciraient la période d'hypoxie et risqueraient d'induire un défaut quantitatif de développement placentaire. Il est envisageable d'observer ceci dans le cadre des retards de croissance intra-utérin isolés, sans anomalies vasculaires associées, sans toxémie. Mais aucune donnée actuelle ne vient étayer cette hypothèse.

Il existe par contre de nombreux arguments pour penser que les défauts de d'invasion placentaire précoce faisant le lit de la toxémie gravidique peuvent être liés au EG-VEGF. En effet, lors de la phase de développement placentaire en hypoxie, nous avons vu que le EG-VEGF est exprimé, et pique juste avant le début de disparition des bouchons trophoblastiques. Il participe ainsi, par un rôle villositaire via PKR-1, à la prolifération cytotrophoblastique et à la constitution des colonnes d'invasion. Nous avons de plus vu que le EG-VEGF avait également un rôle extravillositaire sur les trophoblastes, via PKR-2. Il participe ainsi à la « synchronisation » du départ des TEV dans la décidue maternelle, empêchant, tant qu'il est exprimé, un envahissement prématuré des vaisseaux maternels. Dans la toxémie gravidique, il existe de forts arguments pour penser que l'hypoxie de la chambre intervillieuse persiste. J'ai donc émis l'hypothèse que le EG-VEGF pourrait alors (cause ou conséquence ?) être exprimé de façon anormale et persister de façon trop élevée après la 14^{ème} SA. Ainsi, il pourrait être un marqueur précoce de toxémie gravidique, marqueur d'un défaut de placentation, et non marqueur d'une dysfonction endothéliale comme les marqueurs proposés actuellement (Redman, Sacks et al. 1999; Maynard, Min et al. 2003; Dokras, Hoffmann et al. 2006; Venkatesha, Toporsian et al. 2006).

PARTIE III : PERSPECTIVES

Perspectives fondamentales

Comme ceci a été présenté dans le chapitre sur les étapes du développement placentaire, nous avons vu que la vascularisation intravillositaire est une composante essentielle de l'établissement placentaire. J'ai centré mon travail sur les fonctions autres que la fonction angiogène de EG-VEGF, fonctions sur les différents types de trophoblastes, mais il est plus que probable que EG-VEGF a aussi un rôle angiogène dans le placenta. Je pense qu'il est important de pouvoir étudier ce rôle sur des cellules endothéliales dérivées de la villosité placentaire. Il est possible d'isoler ce type cellulaire de placenta à terme, et ceci fait partie de nos projets proches. Le EG-VEGF pourrait jouer un rôle dans le développement de la circulation fœtale précoce. Il serait de plus intéressant de quantifier son expression au décours des mûles hydatiformes dans lesquelles la circulation intravillositaire fait défaut, pour la comparer aux grossesses normales de même terme.

Il est également un aspect fondamental des fonctions de EG-VEGF que nous n'avons pas abordé dans ce travail, celui des interactions avec les différents stéroïdes et hormones peptidiques sécrétées par le placenta. Nous avons constaté que le profil d'expression de EG-VEGF au cours du premier trimestre de la grossesse était superposable à celui de l'HCG...

Perspectives cliniques

Quand j'ai émis l'hypothèse selon laquelle le EG-VEGF pourrait être un marqueur précoce de la toxémie gravidique, j'ai réfléchi à un moyen facile de pouvoir étudier l'expression d'EG-VEGF dans le placenta et dans le sérum maternel à la fin du premier trimestre et de pouvoir classer les patientes en deux groupes, en fonction du risque ultérieur de développer une toxémie gravidique.

Nous avons vu que l'analyse Doppler des artères utérines est un bon reflet de l'envahissement des artères utérines, puisque la disparition de leur caractère à haute résistance se traduit par une disparition de l'incisure protodiastolique (notch) (figure 40). De plus, cet examen est non invasif et indolore.

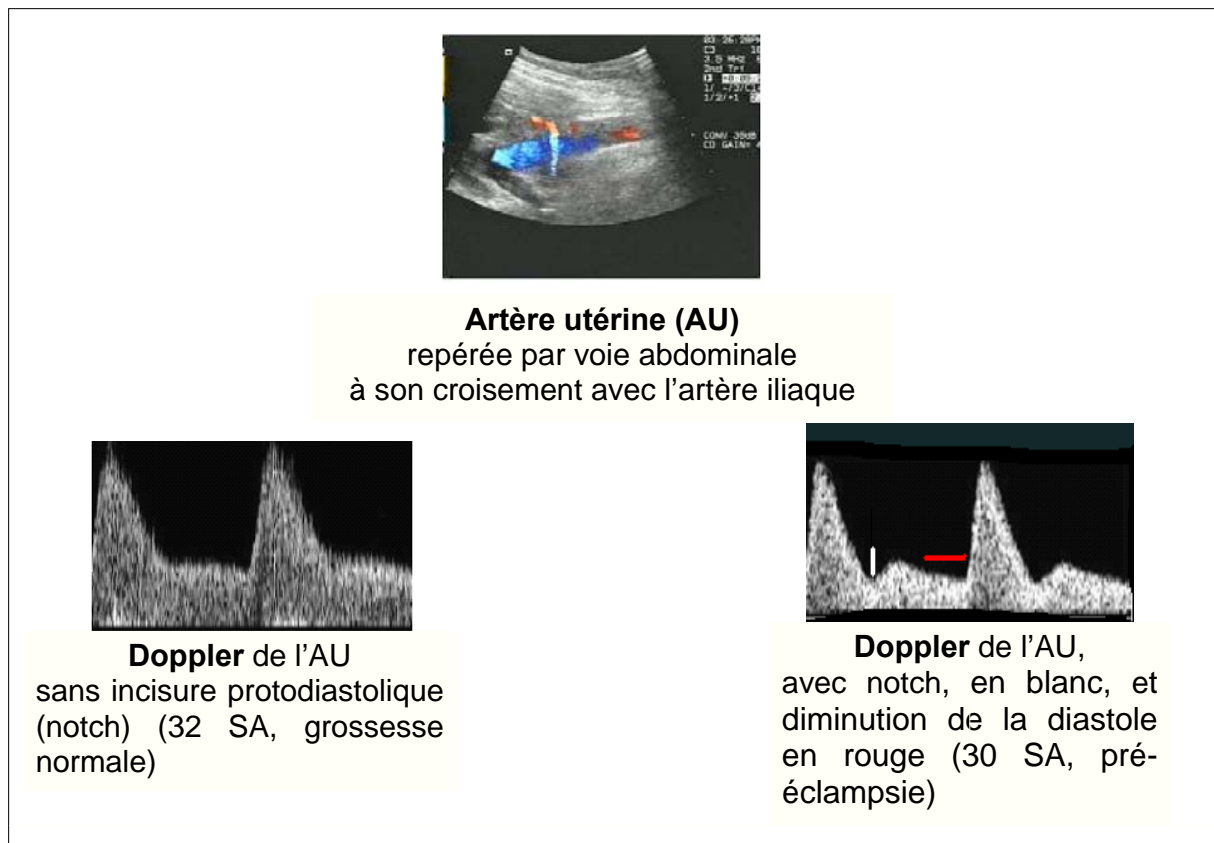


Figure 1: doppler des artères utérines

Enregistrement Doppler de la pression des flux circulant dans une artère utérine, lors d'une grossesse normale à 32 SA à gauche, et d'une pré-éclampsie à 30 SA à droite (clichés du service de Gynécologie-Obstétrique du CHU de grenoble).

Ceci a permis à plusieurs équipes de travailler sur la valeur prédictive du doppler des artères utérines en fin de premier trimestre de grossesse (Coppens, Loquet et al. 1996; Carbillon, Uzan et al. 2004). Elles ont montré que la disparition du notch pouvait se voir dès la 12^{ème} SA, et qu'elle déterminait un groupe à très faible risque de développer une toxémie gravidique (risque 5 fois moins important que dans la population « tout venant »).

J'ai ainsi décidé d'établir une recherche préliminaire grâce aux patientes bénéficiant d'une interruption de grossesse de 12 à 14 SA qui accepteraient de bénéficier d'un doppler des artères utérines juste avant l'intervention. Ceci me permettrait de les classer en deux groupes :

- le premier, avec disparition des l'incisure protodiastolique au doppler, signant la présence d'une circulation optimale dans la chambre intervillieuse

- le deuxième où persisterait un ou deux notch, signant une transformation non encore aboutie des artères utérines et incluant les patientes qui auraient été les plus à risque de développer une pré-éclampsie.

Dix-neuf patientes ont accepté de participer à cette étude préliminaire. Du fait qu'il n'existait pas encore un protocole de recherche accepté par la direction de la recherche clinique et un accord du CCPPRB, nous n'avons pas prélevé de sérum chez ces patientes, puisque aucun prélèvement sanguin n'est fait lors de l'IVG. Nous avons à ce jour étudié l'expression de EG-VEGF par RT-PCR quantitative dans les deux groupes. Les résultats sont très encourageants, même s'il existe une grande dispersion des valeurs à ces termes de la grossesse (puisque'il existe une disparition progressive des bouchons trophoblastiques, et une modification progressive de la pression en oxygène de la chambre intervillieuse). Ils sont présentés figure 41.

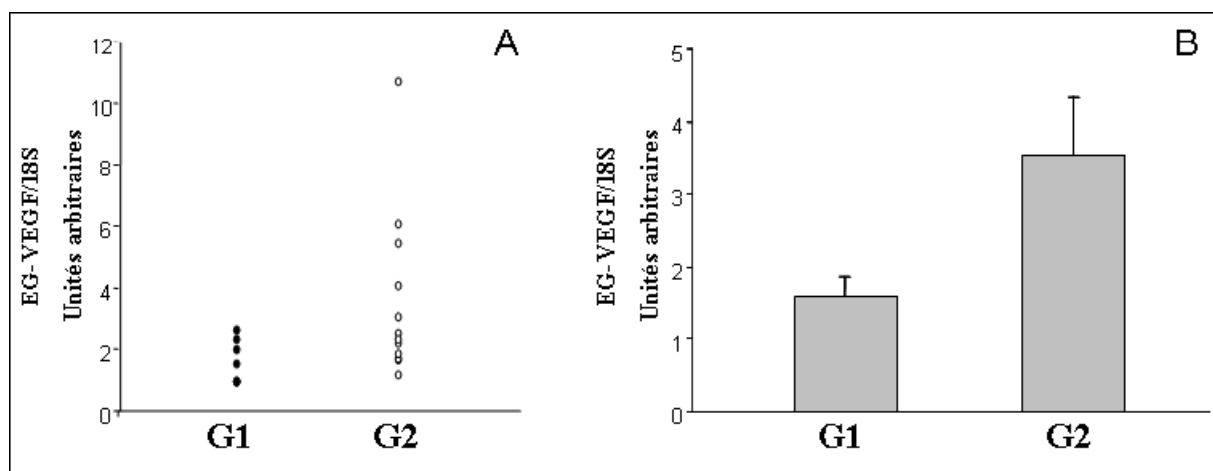


Figure 2: expression du EG-VEGF en fonction du statut doppler des artères utérines, dans des placentas totaux issus d'IVG entre 12 et 14 SA.

Le niveau d'expression a été déterminé par RT-PCR quantitative et normalisé selon le niveau d'expression de 18S. Le logiciel « RealQuant analysis » a été utilisé pour quantifier les niveaux d'expression (Roche Diagnostics). Le groupe 1 (G1) comprend 6 placentas différents de patientes pour lesquelles le doppler utérin montrait une disparition des notches, le groupe 2 (G2) comprend 13 placentas différents de patientes pour lesquelles le doppler des artères utérines montrait encore la persistance d'un ou deux notches. $p = 0,06$, montre une différence non significative entre les niveaux d'expression de EG-VEGF dans les deux groupes, mais une tendance à avoir une expression plus importante dans le groupe 2, groupe plus à risque de développer une toxémie gravidique.

Ce premier résultat nous a incité à proposer une étude avec demande de « Projet Hospitalier Recherche Clinique, CHU promoteur », afin de tester l'hypothèse selon laquelle le EG-VEGF pourrait être un marqueur précoce de non transformation des artères spiralées et donc un marqueur précoce de toxémie gravidique. Il nous reste encore à tester l'hypothèse selon laquelle le EG-VEGF pourrait être une cytokine circulante. Nous avons acquis un kit ELISA (PreProtech, France) et avons collecté une série de séra de patientes volontaires (personnel hospitalier), enceinte et non enceinte de même tranche d'âge, et allons prochainement réaliser les premiers dosages.

Une autre voie de recherche, plus éloignée, sera l'implication potentielle de EG-VEGF dans les premières étapes de l'implantation. En effet, il est maintenant bien établi qu'il existe une variation de l'expression du EG-VEGF au cours du cycle menstruel. D'abord dans le *corpus luteum*, où son expression est plus intense en deuxième partie de cycle, est augmentée par l'HCG et subit des régulations inverses de celles du VEGF (Kisliouk, Podlovni et al. 2005) et est augmentée dans les cellules endothéliales par l'hypoxie, la déprivation de sérum, et le TNF α (Kisliouk, Podlovni et al. 2005). Ensuite dans l'endomètre, avec une expression plus importante également en deuxième phase de cycle, stimulée par la progestérone (Ngan, Lee et al. 2006) (Battersby, Critchley et al. 2004). Il est tentant d'imaginer que le EG-VEGF pourrait participer aux étapes précoces de la prolifération embryonnaire, et être un des acteurs du dialogue endomètre/embryon. De là à le tester comme un marqueur de la capacité implantatoire des embryons issus de fécondation in vitro et à être une aide au transfert unique d'embryon...

Bibliographie

- Adams, R. H., G. A. Wilkinson, et al. (1999). "Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis." Genes Dev **13**(3): 295-306.
- Agrawal, R., H. Jacobs, et al. (2002). "Concentration of vascular endothelial growth factor released by cultured human luteinized granulosa cells is higher in women with polycystic ovaries than in women with normal ovaries." Fertil Steril **78**(6): 1164-9.
- Ahmad, S. and A. Ahmed (2005). "Antiangiogenic effect of soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in placental angiogenesis." Endothelium **12**(1-2): 89-95.
- Ahmed, A., C. Dunk, et al. (2000). "Regulation of placental vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PIGF) and soluble Flt-1 by oxygen--a review." Placenta **21 Suppl A**: S16-24.
- Alfaidy, N., S. Gupta, et al. (2002). "Oxygen regulation of placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2: physiological and pathological implications." J Clin Endocrinol Metab **87**(10): 4797-805.
- Alfaidy, N., W. Li, et al. (2003). "Late gestation increase in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 expression in human fetal membranes: a novel intrauterine source of cortisol." J Clin Endocrinol Metab **88**(10): 5033-8.
- Alsat, E., V. Mirlesse, et al. (1991). "Parathyroid hormone increases epidermal growth factor receptors in cultured human trophoblastic cells from early and term placenta." J Clin Endocrinol Metab **73**(2): 288-95.
- Aplin, J. D. (1995). "Molecular and Cellular Aspects of Peri-implantation Processes, Boston, Massachusetts 15-18 July 1994." Placenta **16**(1): 109-11.
- Athanassiades, A., G. S. Hamilton, et al. (1998). "Vascular endothelial growth factor stimulates proliferation but not migration or invasiveness in human extravillous trophoblast." Biol Reprod **59**(3): 643-54.
- Athanassiades, A. and P. K. Lala (1998). "Role of placenta growth factor (PIGF) in human extravillous trophoblast proliferation, migration and invasiveness." Placenta **19**(7): 465-73.
- Autiero, M., J. Waltenberger, et al. (2003). "Role of PIGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1." Nat Med **9**(7): 936-43.
- Babischkin, J. S., D. L. Suresch, et al. (2006). "Differential Expression of Placental Villous Angiopoietin-1 and -2 During Early, Mid and Late Baboon Pregnancy." Placenta.
- Battersby, S., H. O. Critchley, et al. (2004). "Expression and regulation of the prokineticins (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and Bv8) and their receptors in the human endometrium across the menstrual cycle." J Clin Endocrinol Metab **89**(5): 2463-9.
- Ben-Zimra, M., M. Koler, et al. (2002). "Uterine and placental expression of steroidogenic genes during rodent pregnancy." Mol Cell Endocrinol **187**(1-2): 223-31.
- Berra, E., A. Ginouves, et al. (2006). "The hypoxia-inducible-factor hydroxylases bring fresh air into hypoxia signalling." EMBO Rep **7**(1): 41-5.
- Boisbouvier, J., J. P. Albrand, et al. (1998). "A structural homologue of colipase in black mamba venom revealed by NMR floating disulphide bridge analysis." J Mol Biol **283**(1): 205-19.
- Burrows, T. D., A. King, et al. (1994). "Expression of adhesion molecules by endovascular trophoblast and decidual endothelial cells: implications for vascular invasion during implantation." Placenta **15**(1): 21-33.
- Burton, G. J. and E. Jauniaux (2004). "Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia." J Soc Gynecol Investig **11**(6): 342-52.

- Burton, G. J., E. Jauniaux, et al. (1999). "Maternal arterial connections to the placental intervillous space during the first trimester of human pregnancy: the Boyd collection revisited." Am J Obstet Gynecol **181**(3): 718-24.
- Burton, G. J., J. N. Skepper, et al. (2003). "A reappraisal of the contrasting morphological appearances of villous cytotrophoblast cells during early human pregnancy; evidence for both apoptosis and primary necrosis." Placenta **24**(4): 297-305.
- Caniggia, I., S. Grisaru-Gravnosky, et al. (1999). "Inhibition of TGF-beta 3 restores the invasive capability of extravillous trophoblasts in preeclamptic pregnancies." J Clin Invest **103**(12): 1641-50.
- Caniggia, I., H. Mostachfi, et al. (2000). "Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGFbeta(3)." J Clin Invest **105**(5): 577-87.
- Caniggia, I., J. Winter, et al. (2000). "Oxygen and placental development during the first trimester: implications for the pathophysiology of pre-eclampsia." Placenta **21 Suppl A**: S25-30.
- Carbillon, L., M. Uzan, et al. (2004). "Prospective evaluation of uterine artery flow velocity waveforms at 12-14 and 22-24 weeks of gestation in relation to pregnancy outcome and birth weight." Fetal Diagn Ther **19**(4): 381-4.
- Castellucci, M., G. Kosanke, et al. (2000). "Villous sprouting: fundamental mechanisms of human placental development." Hum Reprod Update **6**(5): 485-94.
- Chaddha, V., S. Viero, et al. (2004). "Developmental biology of the placenta and the origins of placental insufficiency." Semin Fetal Neonatal Med **9**(5): 357-69.
- Challier, J. C. and S. Uzan (2003). "[The human placenta and its pathologies: focus on oxygen]." Med Sci (Paris) **19**(11): 1111-20.
- Charnock-Jones, D. S., P. Kaufmann, et al. (2004). "Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation." Placenta **25**(2-3): 103-13.
- Charnock-Jones, D. S., A. M. Sharkey, et al. (1994). "Vascular endothelial growth factor receptor localization and activation in human trophoblast and choriocarcinoma cells." Biol Reprod **51**(3): 524-30.
- Cheng, M. Y., C. M. Bullock, et al. (2002). "Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus." Nature **417**(6887): 405-10.
- Cheng, M. Y., F. M. Leslie, et al. (2006). "Expression of prokineticins and their receptors in the adult mouse brain." J Comp Neurol **498**(6): 796-809.
- Chennakesava, C. S., S. Di Santo, et al. (2006). "Differential expression of the receptor tyrosine kinase EphB4 and its ligand Ephrin-B2 during human placental development." Placenta **27**(9-10): 959-67.
- Chung, J. Y., Y. Song, et al. (2004). "Differential expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), endocrine gland derived-VEGF, and VEGF receptors in human placentas from normal and preeclamptic pregnancies." J Clin Endocrinol Metab **89**(5): 2484-90.
- Clark, D. E., S. K. Smith, et al. (1998). "A vascular endothelial growth factor antagonist is produced by the human placenta and released into the maternal circulation." Biol Reprod **59**(6): 1540-8.
- Collo, G. and M. S. Pepper (1999). "Endothelial cell integrin alpha5beta1 expression is modulated by cytokines and during migration in vitro." J Cell Sci **112 (Pt 4)**: 569-78.
- Coppens, M., P. Loquet, et al. (1996). "Longitudinal evaluation of uteroplacental and umbilical blood flow changes in normal early pregnancy." Ultrasound Obstet Gynecol **7**(2): 114-21.
- Damsky, C. H., M. L. Fitzgerald, et al. (1992). "Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway, in vivo." J Clin Invest **89**(1): 210-22.

- Davisson, R. L., D. S. Hoffmann, et al. (2002). "Discovery of a spontaneous genetic mouse model of preeclampsia." Hypertension **39**(2 Pt 2): 337-42.
- De Wolf, F., W. B. Robertson, et al. (1975). "The ultrastructure of acute atherosclerosis in hypertensive pregnancy." Am J Obstet Gynecol **123**(2): 164-74.
- Dekker, G. A. and B. M. Sibai (1998). "Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts." Am J Obstet Gynecol **179**(5): 1359-75.
- Dellian, M., B. P. Witwer, et al. (1996). "Quantitation and physiological characterization of angiogenic vessels in mice: effect of basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor, and host microenvironment." Am J Pathol **149**(1): 59-71.
- Demir, R., U. A. Kayisli, et al. (2004). "Sequential expression of VEGF and its receptors in human placental villi during very early pregnancy: differences between placental vasculogenesis and angiogenesis." Placenta **25**(6): 560-72.
- Dokras, A., D. S. Hoffmann, et al. (2006). "Severe Feto-Placental Abnormalities Precede the Onset of Hypertension and Proteinuria in a Mouse Model of Preeclampsia." Biol Reprod.
- Dominguez, F., M. Yanez-Mo, et al. (2005). "Embryonic implantation and leukocyte transendothelial migration: different processes with similar players?" Faseb J **19**(9): 1056-60.
- Dorsch, M., Y. Qiu, et al. (2005). "PK1/EG-VEGF induces monocyte differentiation and activation." J Leukoc Biol **78**(2): 426-34.
- Dunk, C., M. Shams, et al. (2000). "Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 activate trophoblast Tie-2 to promote growth and migration during placental development." Am J Pathol **156**(6): 2185-99.
- Eichmann, A., L. Yuan, et al. (2005). "Vascular development: from precursor cells to branched arterial and venous networks." Int J Dev Biol **49**(2-3): 259-67.
- Eremina, V., M. Sood, et al. (2003). "Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases." J Clin Invest **111**(5): 707-16.
- Ferrara, N., G. Frantz, et al. (2003). "Differential expression of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor (VEGF) and endocrine gland-derived VEGF in normal and polycystic human ovaries." Am J Pathol **162**(6): 1881-93.
- Ferriani, R. A., A. Ahmed, et al. (1994). "Colocalization of acidic and basic fibroblast growth factor (FGF) in human placenta and the cellular effects of bFGF in trophoblast cell line JEG-3." Growth Factors **10**(4): 259-68.
- Foidart, J. M., J. Hustin, et al. (1992). "The human placenta becomes haemochorial at the 13th week of pregnancy." Int J Dev Biol **36**(3): 451-3.
- Fraser, H. M., J. Bell, et al. (2005). "Localization and quantification of cyclic changes in the expression of endocrine gland vascular endothelial growth factor in the human corpus luteum." J Clin Endocrinol Metab **90**(1): 427-34.
- Fukushima, K., S. Miyamoto, et al. (2005). "Tumor necrosis factor and vascular endothelial growth factor induce endothelial integrin repertoires, regulating endovascular differentiation and apoptosis in a human extravillous trophoblast cell line." Biol Reprod **73**(1): 172-9.
- Genbacev, O., R. Joslin, et al. (1996). "Hypoxia alters early gestation human cytotrophoblast differentiation/invasion in vitro and models the placental defects that occur in preeclampsia." J Clin Invest **97**(2): 540-50.
- Genbacev, O., Y. Zhou, et al. (1997). "Regulation of human placental development by oxygen tension." Science **277**(5332): 1669-72.
- Georgiades, P., A. C. Ferguson-Smith, et al. (2002). "Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae." Placenta **23**(1): 3-19.

- Gerety, S. S., H. U. Wang, et al. (1999). "Symmetrical mutant phenotypes of the receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand ephrin-B2 in cardiovascular development." Mol Cell **4**(3): 403-14.
- Gerretsen, G., H. J. Huisjes, et al. (1981). "Morphological changes of the spiral arteries in the placental bed in relation to pre-eclampsia and fetal growth retardation." Br J Obstet Gynaecol **88**(9): 876-81.
- Geva, E., D. G. Ginzinger, et al. (2002). "Human placental vascular development: vasculogenic and angiogenic (branching and nonbranching) transformation is regulated by vascular endothelial growth factor-A, angiopoietin-1, and angiopoietin-2." J Clin Endocrinol Metab **87**(9): 4213-24.
- Goldman-Wohl, D. S., I. Ariel, et al. (2000). "Tie-2 and angiopoietin-2 expression at the fetal-maternal interface: a receptor ligand model for vascular remodelling." Mol Hum Reprod **6**(1): 81-7.
- He, H., V. J. Venema, et al. (1999). "Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through flk-1/KDR activation of c-Src." J Biol Chem **274**(35): 25130-5.
- He, Y., S. K. Smith, et al. (1999). "Alternative splicing of vascular endothelial growth factor (VEGF)-R1 (FLT-1) pre-mRNA is important for the regulation of VEGF activity." Mol Endocrinol **13**(4): 537-45.
- Heckel, G. P. and C. E. Tobin (1956). "Arteriovenous shunts in the myometrium." Am J Obstet Gynecol **71**(1): 199-205.
- Hempstock, J., T. Cindrova-Davies, et al. (2004). "Endometrial glands as a source of nutrients, growth factors and cytokines during the first trimester of human pregnancy: a morphological and immunohistochemical study." Reprod Biol Endocrinol **2**: 58.
- Heroult, M., F. Schaffner, et al. (2006). "Eph receptor and ephrin ligand-mediated interactions during angiogenesis and tumor progression." Exp Cell Res **312**(5): 642-50.
- Hiratsuka, S., O. Minowa, et al. (1998). "Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(16): 9349-54.
- Hoffmann, P., J. J. Feige, et al. (2006). "Expression and oxygen regulation of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 and its receptors in human placenta during early pregnancy." Endocrinology **147**(4): 1675-84.
- Holash, J., S. J. Wiegand, et al. (1999). "New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF." Oncogene **18**(38): 5356-62.
- Jackson, M. R., E. W. Carney, et al. (1994). "Localization of two angiogenic growth factors (PDEC GF and VEGF) in human placenta throughout gestation." Placenta **15**(4): 341-53.
- Jauniaux, E., N. Greenwold, et al. (2003). "Comparison of ultrasonographic and Doppler mapping of the intervillous circulation in normal and abnormal early pregnancies." Fertil Steril **79**(1): 100-6.
- Jauniaux, E., J. Hempstock, et al. (2003). "Trophoblastic oxidative stress in relation to temporal and regional differences in maternal placental blood flow in normal and abnormal early pregnancies." Am J Pathol **162**(1): 115-25.
- Jauniaux, E., A. Watson, et al. (1999). "In-vivo measurement of intrauterine gases and acid-base values early in human pregnancy." Hum Reprod **14**(11): 2901-4.
- Jauniaux, E., A. L. Watson, et al. (2000). "Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure." Am J Pathol **157**(6): 2111-22.

- Joubert, F. J. and D. J. Strydom (1980). "Snake venom. The amino acid sequence of protein A from *Dendroaspis polylepis polylepis* (black mamba) venom." Hoppe Seylers Z Physiol Chem **361**(12): 1787-94.
- Karumanchi, S. A. and I. E. Stillman (2006). "In vivo rat model of preeclampsia." Methods Mol Med **122**: 393-9.
- Kaser, A., M. Winklmayr, et al. (2003). "The AVIT protein family. Secreted cysteine-rich vertebrate proteins with diverse functions." EMBO Rep **4**(5): 469-73.
- Kaufmann, P., T. M. Mayhew, et al. (2004). "Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy." Placenta **25**(2-3): 114-26.
- Kendall, R. L. and K. A. Thomas (1993). "Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(22): 10705-9.
- Kingdom, J. C. and P. Kaufmann (1999). "Oxygen and placental vascular development." Adv Exp Med Biol **474**: 259-75.
- Kisliouk, T., N. Levy, et al. (2003). "Presence and regulation of endocrine gland vascular endothelial growth factor/prokineticin-1 and its receptors in ovarian cells." J Clin Endocrinol Metab **88**(8): 3700-7.
- Kisliouk, T., H. Podlovni, et al. (2005). "Unique expression and regulatory mechanisms of EG-VEGF/prokineticin-1 and its receptors in the corpus luteum." Ann Anat **187**(5-6): 529-37.
- Kisliouk, T., H. Podlovni, et al. (2005). "Prokineticins (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and BV8) in the bovine ovary: expression and role as mitogens and survival factors for corpus luteum-derived endothelial cells." Endocrinology **146**(9): 3950-8.
- Kliman, H. J. (2000). "Uteroplacental blood flow. The story of decidualization, menstruation, and trophoblast invasion." Am J Pathol **157**(6): 1759-68.
- Kliman, H. J., J. E. Nestler, et al. (1986). "Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae." Endocrinology **118**(4): 1567-82.
- Koga, K., Y. Osuga, et al. (2003). "Elevated serum soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 (sVEGFR-1) levels in women with preeclampsia." J Clin Endocrinol Metab **88**(5): 2348-51.
- Kumazaki, K., M. Nakayama, et al. (2002). "Expression of vascular endothelial growth factor, placental growth factor, and their receptors Flt-1 and KDR in human placenta under pathologic conditions." Hum Pathol **33**(11): 1069-77.
- Lambert, C. M., K. K. Machida, et al. (2005). "Analysis of the prokineticin 2 system in a diurnal rodent, the unstriped Nile grass rat (*Arvicanthis niloticus*)." J Biol Rhythms **20**(3): 206-18.
- Lash, G. E., J. E. Cartwright, et al. (1999). "The effects of angiogenic growth factors on extravillous trophoblast invasion and motility." Placenta **20**(8): 661-7.
- le Noble, F., D. Moyon, et al. (2004). "Flow regulates arterial-venous differentiation in the chick embryo yolk sac." Development **131**(2): 361-75.
- LeCouter, J. and N. Ferrara (2002). "EG-VEGF and the concept of tissue-specific angiogenic growth factors." Semin Cell Dev Biol **13**(1): 3-8.
- LeCouter, J. and N. Ferrara (2003). "EG-VEGF and Bv8. a novel family of tissue-selective mediators of angiogenesis, endothelial phenotype, and function." Trends Cardiovasc Med **13**(7): 276-82.
- LeCouter, J., J. Kowalski, et al. (2001). "Identification of an angiogenic mitogen selective for endocrine gland endothelium." Nature **412**(6850): 877-84.
- LeCouter, J., R. Lin, et al. (2002). "Endocrine gland-derived VEGF and the emerging hypothesis of organ-specific regulation of angiogenesis." Nat Med **8**(9): 913-7.

- LeCouter, J., R. Lin, et al. (2002). "The role of EG-VEGF in the regulation of angiogenesis in endocrine glands." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **67**: 217-21.
- LeCouter, J., R. Lin, et al. (2003). "Mouse endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor: a distinct expression pattern from its human ortholog suggests different roles as a regulator of organ-specific angiogenesis." Endocrinology **144**(6): 2606-16.
- LeCouter, J., R. Lin, et al. (2003). "The endocrine-gland-derived VEGF homologue Bv8 promotes angiogenesis in the testis: Localization of Bv8 receptors to endothelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(5): 2685-90.
- LeCouter, J., C. Zlot, et al. (2004). "Bv8 and endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor stimulate hematopoiesis and hematopoietic cell mobilization." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(48): 16813-8.
- Lee, A., L. K. Christenson, et al. (1997). "Vascular endothelial growth factor production by human luteinized granulosa cells in vitro." Hum Reprod **12**(12): 2756-61.
- Levine, R. J., S. E. Maynard, et al. (2004). "Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia." N Engl J Med **350**(7): 672-83.
- Li, H., B. Gu, et al. (2005). "Hypoxia-induced increase in soluble Flt-1 production correlates with enhanced oxidative stress in trophoblast cells from the human placenta." Placenta **26**(2-3): 210-7.
- Li, M., C. M. Bullock, et al. (2001). "Identification of two prokineticin cDNAs: recombinant proteins potently contract gastrointestinal smooth muscle." Mol Pharmacol **59**(4): 692-8.
- Lin, D. C., C. M. Bullock, et al. (2002). "Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor." J Biol Chem **277**(22): 19276-80.
- Lin, R., J. LeCouter, et al. (2002). "Characterization of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor signaling in adrenal cortex capillary endothelial cells." J Biol Chem **277**(10): 8724-9.
- Luo, Z. C., W. D. Fraser, et al. (2006). "Tracing the origins of "fetal origins" of adult diseases: programming by oxidative stress?" Med Hypotheses **66**(1): 38-44.
- Maisonpierre, P. C., C. Suri, et al. (1997). "Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis." Science **277**(5322): 55-60.
- Malassine, A., J. L. Frendo, et al. (2003). "A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model." Hum Reprod Update **9**(6): 531-9.
- Martin, J. N., Jr., C. H. Rose, et al. (2006). "Understanding and managing HELLP syndrome: the integral role of aggressive glucocorticoids for mother and child." Am J Obstet Gynecol **195**(4): 914-34.
- Masuda, Y., Y. Takatsu, et al. (2002). "Isolation and identification of EG-VEGF/prokineticins as cognate ligands for two orphan G-protein-coupled receptors." Biochem Biophys Res Commun **293**(1): 396-402.
- Mayhew, T. M. (2003). "Changes in fetal capillaries during preplacental hypoxia: growth, shape remodelling and villous capillarization in placentae from high-altitude pregnancies." Placenta **24**(2-3): 191-8.
- Maynard, S. E., J. Y. Min, et al. (2003). "Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia." J Clin Invest **111**(5): 649-58.
- McGee, E. A. and A. J. Hsueh (2000). "Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles." Endocr Rev **21**(2): 200-14.
- Meekins, J. W., R. Pijnenborg, et al. (1994). "A study of placental bed spiral arteries and trophoblast invasion in normal and severe pre-eclamptic pregnancies." Br J Obstet Gynaecol **101**(8): 669-74.

- Melchiorri, D., V. Bruno, et al. (2001). "The mammalian homologue of the novel peptide Bv8 is expressed in the central nervous system and supports neuronal survival by activating the MAP kinase/PI-3-kinase pathways." Eur J Neurosci **13**(9): 1694-702.
- Mollay, C., C. Wechselberger, et al. (1999). "Bv8, a small protein from frog skin and its homologue from snake venom induce hyperalgesia in rats." Eur J Pharmacol **374**(2): 189-96.
- Nagamatsu, T., T. Fujii, et al. (2004). "Cytotrophoblasts up-regulate soluble fms-like tyrosine kinase-1 expression under reduced oxygen: an implication for the placental vascular development and the pathophysiology of preeclampsia." Endocrinology **145**(11): 4838-45.
- Negri, L., R. Lattanzi, et al. (2006). "Impaired nociception and inflammatory pain sensation in mice lacking the prokineticin receptor PKR1: focus on interaction between PKR1 and the capsaicin receptor TRPV1 in pain behavior." J Neurosci **26**(25): 6716-27.
- Negri, L., R. Lattanzi, et al. (2004). "Bv8, the amphibian homologue of the mammalian prokineticins, modulates ingestive behaviour in rats." Br J Pharmacol **142**(1): 181-91.
- Neufeld, G., T. Cohen, et al. (1999). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors." Faseb J **13**(1): 9-22.
- Neulen, J., S. Raczek, et al. (1998). "Secretion of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor from human luteinized granulosa cells is human chorionic gonadotrophin dependent." Mol Hum Reprod **4**(3): 203-6.
- Ngan, E. S., K. Y. Lee, et al. (2006). "Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor is expressed in human peri-implantation endometrium, but not in endometrial carcinoma." Endocrinology **147**(1): 88-95.
- Palade, G. E., M. Simionescu, et al. (1979). "Structural aspects of the permeability of the microvascular endothelium." Acta Physiol Scand Suppl **463**: 11-32.
- Papapetropoulos, A., G. Garcia-Cardena, et al. (1999). "Direct actions of angiopoietin-1 on human endothelium: evidence for network stabilization, cell survival, and interaction with other angiogenic growth factors." Lab Invest **79**(2): 213-23.
- Patan, S. (1998). "TIE1 and TIE2 receptor tyrosine kinases inversely regulate embryonic angiogenesis by the mechanism of intussusceptive microvascular growth." Microvasc Res **56**(1): 1-21.
- Pijnenborg, R., W. B. Robertson, et al. (1975). "The role of ovarian steroids in placental development and endovascular trophoblast migration in the golden hamster." J Reprod Fertil **44**(1): 43-51.
- Pijnenborg, R., W. B. Robertson, et al. (1985). "Morphological aspects of placental ontogeny and phylogeny." Placenta **6**(2): 155-62.
- Podjarny, E., G. Losonczy, et al. (2004). "Animal models of preeclampsia." Semin Nephrol **24**(6): 596-606.
- Polliotti, B. M., A. G. Fry, et al. (2003). "Second-trimester maternal serum placental growth factor and vascular endothelial growth factor for predicting severe, early-onset preeclampsia." Obstet Gynecol **101**(6): 1266-74.
- Pugh, C. W. and P. J. Ratcliffe (2003). "Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system." Nat Med **9**(6): 677-84.
- Qian, D., H. Y. Lin, et al. (2004). "Involvement of ERK1/2 pathway in TGF-beta1-induced VEGF secretion in normal human cytotrophoblast cells." Mol Reprod Dev **68**(2): 198-204.
- Red-Horse, K., M. Kapidzic, et al. (2005). "EPHB4 regulates chemokine-evoked trophoblast responses: a mechanism for incorporating the human placenta into the maternal circulation." Development **132**(18): 4097-106.
- Red-Horse, K., J. Rivera, et al. (2006). "Cytotrophoblast induction of arterial apoptosis and lymphangiogenesis in an in vivo model of human placentation." J Clin Invest **116**(10): 2643-52.

- Redman, C. W., G. P. Sacks, et al. (1999). "Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy." *Am J Obstet Gynecol* **180**(2 Pt 1): 499-506.
- Redman, C. W. and I. L. Sargent (2005). "Latest advances in understanding preeclampsia." *Science* **308**(5728): 1592-4.
- Risau, W. (1997). "Mechanisms of angiogenesis." *Nature* **386**(6626): 671-4.
- Roberts, W. G., J. Delaat, et al. (1998). "Host microvasculature influence on tumor vascular morphology and endothelial gene expression." *Am J Pathol* **153**(4): 1239-48.
- Rodesch, F., P. Simon, et al. (1992). "Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy." *Obstet Gynecol* **80**(2): 283-5.
- Rossant, J. and J. C. Cross (2001). "Placental development: lessons from mouse mutants." *Nat Rev Genet* **2**(7): 538-48.
- Samson, M., F. V. Peale, Jr., et al. (2004). "Human endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor: expression early in development and in Leydig cell tumors suggests roles in normal and pathological testis angiogenesis." *J Clin Endocrinol Metab* **89**(8): 4078-88.
- Sato, T. N., Y. Tozawa, et al. (1995). "Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation." *Nature* **376**(6535): 70-4.
- Schaaps, J. P., V. Tsatsaris, et al. (2005). "Shunting the intervillous space: new concepts in human uteroplacental vascularization." *Am J Obstet Gynecol* **192**(1): 323-32.
- Schaffer, L., A. Scheid, et al. (2003). "Oxygen-regulated expression of TGF-beta 3, a growth factor involved in trophoblast differentiation." *Placenta* **24**(10): 941-50.
- Schweitz, H., J. N. Bidard, et al. (1990). "Purification and pharmacological characterization of peptide toxins from the black mamba (*Dendroaspis polylepis*) venom." *Toxicon* **28**(7): 847-56.
- Schweitz, H., P. Pacaud, et al. (1999). "MIT(1), a black mamba toxin with a new and highly potent activity on intestinal contraction." *FEBS Lett* **461**(3): 183-8.
- Shalaby, F., J. Rossant, et al. (1995). "Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice." *Nature* **376**(6535): 62-6.
- Sharkey, A. M., D. S. Charnock-Jones, et al. (1993). "Expression of mRNA for vascular endothelial growth factor in human placenta." *J Reprod Fertil* **99**(2): 609-15.
- Shweiki, D., A. Itin, et al. (1993). "Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis." *J Clin Invest* **91**(5): 2235-43.
- Sibai, B., G. Dekker, et al. (2005). "Pre-eclampsia." *Lancet* **365**(9461): 785-99.
- Smith, S. K. (2000). "Angiogenesis and implantation." *Hum Reprod* **15** Suppl 6: 59-66.
- Soga, T., S. Matsumoto, et al. (2002). "Molecular cloning and characterization of prokineticin receptors." *Biochim Biophys Acta* **1579**(2-3): 173-9.
- Soghomonians, A., A. I. Barakat, et al. (2005). "Trophoblast migration under flow is regulated by endothelial cells." *Biol Reprod* **73**(1): 14-9.
- Soma, H., K. Yoshida, et al. (1982). "Morphologic changes in the hypertensive placenta." *Contrib Gynecol Obstet* **9**: 58-75.
- Stacker, S. A., C. Caesar, et al. (2001). "VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics." *Nat Med* **7**(2): 186-91.
- Staun-Ram, E. and E. Shalev (2005). "Human trophoblast function during the implantation process." *Reprod Biol Endocrinol* **3**: 56.
- Stewart, P. A. and M. J. Wiley (1981). "Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: a study using quail--chick transplantation chimeras." *Dev Biol* **84**(1): 183-92.
- Suri, C., P. F. Jones, et al. (1996). "Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis." *Cell* **87**(7): 1171-80.

- Takahashi, H. and M. Shibuya (2005). "The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions." Clin Sci (Lond) **109**(3): 227-41.
- Tarrade, A., R. Lai Kuen, et al. (2001). "Characterization of human villous and extravillous trophoblasts isolated from first trimester placenta." Lab Invest **81**(9): 1199-211.
- Taylor, R. N., J. Grimwood, et al. (2003). "Longitudinal serum concentrations of placental growth factor: evidence for abnormal placental angiogenesis in pathologic pregnancies." Am J Obstet Gynecol **188**(1): 177-82.
- Thomas, M., M. Keramidas, et al. (2003). "Role of adrenocorticotrophic hormone in the development and maintenance of the adrenal cortical vasculature." Microsc Res Tech **61**(3): 247-51.
- Torry, D. S., M. Hinrichs, et al. (2004). "Determinants of placental vascularity." Am J Reprod Immunol **51**(4): 257-68.
- Venkatesha, S., M. Toporsian, et al. (2006). "Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia." Nat Med **12**(6): 642-9.
- Vikkula, M., L. M. Boon, et al. (1996). "Vascular dysmorphogenesis caused by an activating mutation in the receptor tyrosine kinase TIE2." Cell **87**(7): 1181-90.
- Vuckovic, M., J. Ponting, et al. (1996). "Expression of the vascular endothelial growth factor receptor, KDR, in human placenta." J Anat **188** (Pt 2): 361-6.
- Vuorela, P., O. Carpen, et al. (2000). "VEGF, its receptors and the tie receptors in recurrent miscarriage." Mol Hum Reprod **6**(3): 276-82.
- Wang, H. U., Z. F. Chen, et al. (1998). "Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4." Cell **93**(5): 741-53.
- Wang, J., F. Luo, et al. (2002). "VEGF expression and enhanced production by gonadotropins in ovarian epithelial tumors." Int J Cancer **97**(2): 163-7.
- Wechselberger, C., R. Puglisi, et al. (1999). "The mammalian homologues of frog Bv8 are mainly expressed in spermatocytes." FEBS Lett **462**(1-2): 177-81.
- Wilting, J., R. Birkenhager, et al. (1996). "VEGF121 induces proliferation of vascular endothelial cells and expression of flk-1 without affecting lymphatic vessels of chorioallantoic membrane." Dev Biol **176**(1): 76-85.
- Wulff, C., M. Weigand, et al. (2003). "Angiogenesis during primate placentation in health and disease." Reproduction **126**(5): 569-77.
- Wulff, C., H. Wilson, et al. (2002). "Hemochorial placentation in the primate: expression of vascular endothelial growth factor, angiopoietins, and their receptors throughout pregnancy." Biol Reprod **66**(3): 802-12.
- Yancopoulos, G. D., S. Davis, et al. (2000). "Vascular-specific growth factors and blood vessel formation." Nature **407**(6801): 242-8.
- Yancopoulos, G. D., M. Klagsbrun, et al. (1998). "Vasculogenesis, angiogenesis, and growth factors: ephrins enter the fray at the border." Cell **93**(5): 661-4.
- Yang, J. C., L. Haworth, et al. (2003). "A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer." N Engl J Med **349**(5): 427-34.
- Zhang, E. G., S. K. Smith, et al. (2001). "The regulation and localization of angiopoietin-1, -2, and their receptor Tie2 in normal and pathologic human placentae." Mol Med **7**(9): 624-35.
- Zhang, L., N. Yang, et al. (2003). "Expression of endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor in ovarian carcinoma." Clin Cancer Res **9**(1): 264-72.

- Zhou, Y., V. Bellinard, et al. (2003). "Human cytotrophoblasts promote endothelial survival and vascular remodeling through secretion of Ang2, PlGF, and VEGF-C." Dev Biol **263**(1): 114-25.
- Zhou, Y., S. J. Fisher, et al. (1997). "Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion?" J Clin Invest **99**(9): 2139-51.
- Zhou, Y., M. McMaster, et al. (2002). "Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome." Am J Pathol **160**(4): 1405-23.
- Ziche, M., D. Maglione, et al. (1997). "Placenta growth factor-1 is chemotactic, mitogenic, and angiogenic." Lab Invest **76**(4): 517-31.